

Joanna Magdalena Cieloszyk

Caracterización molecular de
especies, genotipos y subtipos de
cryptosporidium spp. aislados en
humanos en España e
identificación de *giardia duodenalis*
por técnicas moleculares

Departamento

Microbiología, Medicina Preventiva y Salud
Pública

Director/es

Clavel Parrilla, Antonio
Goñi Cepero, María Pilar

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
ESPECIES, GENOTIPOS Y SUBTIPOS
DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. AISLADOS
EN HUMANOS EN ESPAÑA E
IDENTIFICACIÓN DE *GIARDIA DUODENALIS*
POR TÉCNICAS MOLECULARES

Autor

Joanna Magdalena Cieloszyk

Director/es

Clavel Parrilla, Antonio

Goñi Cepero, María Pilar

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

2016

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES,
GENOTIPOS Y SUBTIPOS DE *CRYPTOSPORIDIUM*
SPP. AISLADOS EN HUMANOS EN ESPAÑA E
IDENTIFICACIÓN DE *GIARDIA DUODENALIS* POR
TÉCNICAS MOLECULARES.

Autor

JOANNA CIELOSZYK

Directores

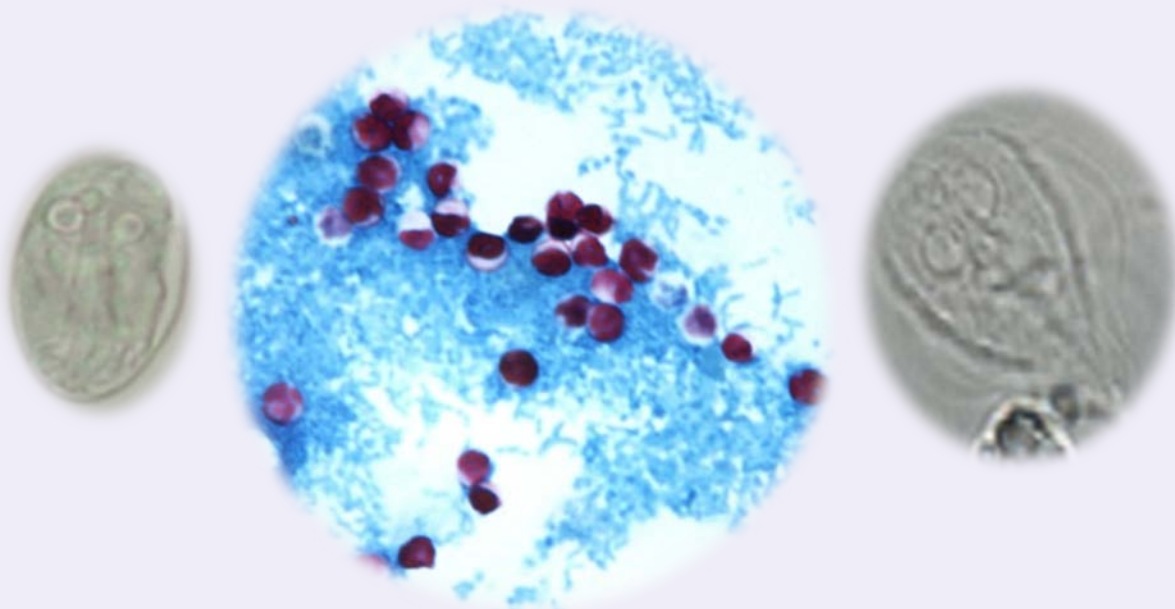
MARÍA PILAR GOÑI CEPERO
ANTONIO CLAVEL PARILLA

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
MICROBIOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA
2016



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Departamento de Microbiología,
Medicina Preventiva y Salud Pública
TESIS DOCTORAL

**Caracterización molecular de especies,
genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* spp.
aislados en humanos en España
e identificación de *Giardia duodenalis*
por técnicas moleculares.**



**Joanna Cieloszyk
2016**

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública



**“Caracterización molecular de especies,
genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* spp.
aislados en humanos en España
e identificación de *Giardia duodenalis* por
técnicas moleculares”**

Memoria presentada por **Joanna Cieloszyk**
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza
2016

Dirigida por

Dra. M^a Pilar Goñi Cepero

Dr. Antonio Clavel Parilla



**Departamento de
Microbiología, Medicina
Preventiva y Salud Pública
Universidad Zaragoza**

Los Dres. M^a Pilar Goñi Cepero y Antonio Clavel Parrilla, Profesora Contratado-Doctor y Catedrático respectivamente, del Área de Parasitología, del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza,

HACEN CONSTAR

Que Dña Joanna Cieloszyk, ha realizado bajo su tutela y dirección, el trabajo, que corresponde al proyecto aprobado en fecha 07 de septiembre de 2012, titulado:

Caracterización molecular de especies, genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* spp. aislados en humanos en España e identificación de *Giardia duodenalis* por técnicas moleculares.

Revisado el contenido de la memoria, consideran que el trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

En Zaragoza, a 02 de diciembre de 2015

Fdo.: M^a Pilar Goñi Cepero

Fdo.: Antonio Clavel Parrilla

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas e instituciones que han contribuido en la realización de esta tesis. De manera especial quiero agradecer:

A mis Directores de la Tesis, Dra. María Pilar Goñi Cepero y Dr. Antonio Clavel Parilla por haberme aceptado ser parte de su grupo de investigación, dejándome la posibilidad de desarrollar esta Tesis Doctoral.

En especial quiero agradecer a la Dra. Goñi por su permanente apoyo y horas dedicadas a la elaboración de esta Tesis, así como por su gran paciencia, entusiasmo y valiosos consejos. Sin sus enseñanzas no hubiera podido llegar tan lejos. Mil gracias!!!

A Dra. María Antonia Remacha del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital de León y la Dra. Cristina Seral y Dra. Elena Sánchez del Servicio de Microbiología y Parasitología, del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza, la Dra. Encarna Rubio del Área de Bioestadística por su colaboración en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Al Dr. José Gutiérrez por haberme proporcionado las muestras del brote de Granada.

A todos mis compañeros y técnicos del Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública que siempre me han ayudado y aconsejado. En especial a Patricia por todos los buenos momentos y porque siempre está dispuesta a ayudarme cuando lo necesito.

A mis amigos por su confianza y compañía y por estar siempre ahí para mí.

Y por último, pero no menos importante, a mi familia, especialmente a mis padres y mi marido Eric por su amor, ayuda, enorme paciencia y por animarme siempre a seguir adelante. A mis queridos hijos, Diego y Victor que son mi mayor alegría y orgullo y porque todos los días me demuestran su amor y me alegran la vida...

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

- Proyecto FIS PI09/1585
- Grupo Emergente B124 “Parasitología, autocuidados y salud ambiental”.
Diputación General de Aragón.
- Proyecto UZ2013-FIS-02. Universidad de Zaragoza

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>CRYPTOSPORIDIUM</i> Y CRYPTOSPORIDIOSIS	1
Breve historia	1
Distribución	3
Ciclo de vida y morfología	4
Clasificación taxonómica	8
Epidemiología	10
Mecanismos de transmisión	13
Síntomas de la infección	17
Tratamiento	18
Profilaxis y prevención	19
<i>GIARDIA DUODENALIS</i> Y GIARDIOSIS	20
Breve historia	20
Distribución (Epidemiología)	20
Ciclo de vida y morfología	21
Clasificación taxonómica	26
Epidemiología molecular	30
Mecanismos de transmisión	31
Mecanismos de patogenicidad	33
Síntomas de la infección	34
Diagnóstico	35
Tratamiento	36
OBJETIVOS	37
Objetivos generales	37
Objetivos específicos	37

MATERIAL Y MÉTODOS	39
MUESTRAS	39
<i>Cryptosporidium</i> spp.	39
<i>Giardia</i> spp.	39
MÉTODOS	40
Técnica de concentración	40
<i>Cryptosporidium</i> spp.	40
<i>Giardia</i> spp.	40
Tinción Ziehl-Neelsen modificada para <i>Cryptosporidium</i> spp.	42
Microscopía	43
<i>Cryptosporidium</i> spp.	43
<i>Giardia</i> spp.	44
Extracción de ADN genómico de <i>Cryptosporidium</i> spp. y <i>Giardia</i> spp.	45
Técnicas moleculares para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.	46
PCR-RFLP (<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>) de un fragmento del gen <i>SSU rRNA</i>	46
PCR – reacción en cadena de la polimerasa	46
RFLP – análisis de polimorfismo de los fragmentos de restricción	48
PCR de un fragmento del gen <i>gp60</i>	49
Técnicas moleculares para la detección de <i>Giardia duodenalis</i>	52
PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) del gen <i>tpi</i>	52
PCR del gen de la β -giardina	54
Electroforesis en el gel de agarosa	56
Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas	58
RESULTADOS	59
<i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP.	59

Observación microscópica	62
Tipificación molecular	63
Estructura de población general	67
Distribución de los casos según su origen	67
Estacionalidad	69
Distribución de las especies por intervalos de la edad de los pacientes	70
Otras asociaciones	72
Identificación de subtipos de <i>Cryptosporidium</i>	73
Asociaciones con subtipos de <i>Cryptosporidium</i> y otros factores	78
Edad de los pacientes	78
Año de aislamiento	79
Mes de aislamiento	80
Estructura de las poblaciones de <i>Cryptosporidium</i> circulantes por ciudades	81
León	81
Distribución de los casos según su origen	81
Estacionalidad	83
Asociaciones con subtipos	84
Zaragoza	89
Distribución de los casos según su origen	89
Estacionalidad	91
Asociaciones entre subtipos y los factores estudiados	92
Granada	96
Estudio de las secuencias obtenidas	97
Subtipos de <i>Cryptosporidium hominis</i> caracterizados en el estudio	97
Subtipos <i>Cryptosporidium parvum</i>	107
<i>Cryptosporidium ubiquitum</i>	115

<i>Cryptosporidium felis</i>	117
Relación filogenética entre todos los subtipos de <i>Cryptosporidium</i> objeto de estudio	119
Comparación de técnicas de diagnóstico: tinción frente a PCR	123
Immunocromatografía de <i>Giardia duodenalis</i>	124
GIARDIA DUODENALIS	125
Resumen de los pacientes	143
Estudio de las secuencias	144
Análisis estadística de las secuencias	146
DISCUSIÓN	149
CRYPTOSPORIDIUM SPP.	149
Especies	151
Estructura de la población estudiada en general	154
Distribución de los casos según su origen	154
Estacionalidad	155
Edad	155
Género	156
Subtipos	156
Estructura de las poblaciones circulantes de <i>Cryptosporidium</i> por ciudades	168
León	168
Distribución de los casos según su origen	168
Estacionalidad	168
Asociaciones con subtipos	168
Zaragoza	170
Distribución de los casos según su origen	170
Estacionalidad	170

Asociaciones con subtipos.....	171
Granada.....	173
Comparación de las técnicas.....	174
Inmunocromatografía de <i>Giardia duodenalis</i>	174
<i>GIARDIA DUODENALIS</i>	176
CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFÍA	183
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS	199

INTRODUCCIÓN

CRYPTOSPORIDIUM Y CRYPTOSPORIDIOSIS

Breve historia

Fue Clarke quien, en 1895, observó por primera vez ooquistes de *Cryptosporidium* en el epitelio gástrico de un ratón. Los describió como “múltiples esporas situadas sobre epitelio gástrico” y las identificó como *Eimeria falciforme*.

Estos parásitos fueron considerados “comensales benignos” hasta principios de los años setenta, cuando los reconocieron como causa principal de diarrea en animales (Hoepelman, 1996).

En 1907, un parasitólogo americano, E. E. Tyzzer, describió *Cryptosporidium* como un nuevo microorganismo que se encontraba con frecuencia en las glándulas gástricas de ratones en laboratorio. Para él propuso el nombre de *Cryptosporidium muris* y, en 1910 describió con detalle su estructura (Fayer and Ungar, 1986).

La siguiente especie de *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum* fue encontrado por Tyzzer, en 1912, en el intestino delgado del ratón en laboratorio.

En los años siguientes se han descrito más especies en varios hospedadores animales, lo que le ha valido su importancia en veterinaria, pero hasta 1976 no se describieron los primeros casos en personas. El primer caso descrito en humanos en una niña previamente sana de 3 años (Nime et al 1976) y el segundo en un varón de 39 años inmunodeprimido (Meisel et al 1976). Hasta el año 1982, sólo se observaron casos esporádicos de *Cryptosporidium* en humanos. Pero a principios de los años 80, coincidiendo con la aplicación de técnicas de tinción ácido resistente, se describieron muchos casos, especialmente, afectando a personas con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En 1982, el CDC informó que 14 de 21 pacientes con SIDA murió a causa de diarreas agudas provocadas por cryptosporidiosis (Hoepelman 1996), lo que daba idea del carácter oportunista de este protozoo.

Posteriormente, *Cryptosporidium* fue reconocido como un riesgo para la salud pública, difícil de controlar tras el brote ocurrido en la ciudad de Milwaukee, en el año 1993. Debido a un fallo en los sistemas de filtración de las plantas de potabilización de agua de la ciudad, los ooquistes de *Cryptosporidium* llegaron al consumo humano produciendo diarrea en 403.000 personas (Mac Kenzie et al., 1995) lo que dejó ver que la cryptosporidiosis puede afectar también a personas sin inmunodeficiencia. Más de 100 personas murieron como consecuencia del brote, la mayoría de ellas mayores e inmunodeprimidas.

El último brote publicado de cryptosporidiosis en Europa ocurrió en el año 2010. Es el brote más grande de Europa y el segundo más grande del mundo después del de Milwaukee. Afectó a unos 27.000 habitantes de Östersund, Suecia y el origen del contagio fue el agua potable de la ciudad (Widerström et al., 2014).

En España hasta la fecha no hay muchos datos sobre la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en humanos. Las publicaciones sobre cryptosporidiosis en adultos y niños han sido realizadas entre otros por: Clavel et al., 1996, Navarro i Martinez et al., 2011, Navarro i Martinez et al., 2012, Martin-Ampudia et al., 2012, Arieda et al., 2012 y Galván et al., 2014.

El interés por la cryptosporidiosis se ve incrementado por la falta de estrategias adecuadas para su tratamiento en humanos y animales. Por otro lado, los ooquistes de *Cryptosporidium* son resistentes a muchos de los desinfectantes comerciales utilizados actualmente.

Distribución

La cryptosporidiosis es una zoonosis de amplia distribución mundial. Se ha encontrado en humanos y en varias especies de animales en todas partes del mundo excepto en la Antártida.

En los países desarrollados la prevalencia de cryptosporidiosis se sitúa entre <1% a 4,5%, mientras que en los países en desarrollo esta tasa es mucho más elevada - entre 3% y 20%. (<http://www.viajarseguro.org/>)

En España los datos de la infección por *Cryptosporidium* spp. son escasos, ya que hasta el año 2009 no hubo obligación de notificar cryptosporidiosis a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Por eso los datos, que proceden principalmente de los hospitales, cubren un 25% de la población y revelan 1.676 casos de infección entre año 1995 y 2009 (Navarro-i-Martinez et al., 2011).

La prevalencia tanto de *Cryptosporidium* spp. como de *Giardia duodenalis* en España está infravalorada, ya que en este país han sido las enfermedades de declaración voluntaria hasta el 27 de marzo de 2015, fecha en la que fueron incluidas en la lista de enfermedades de declaración obligatoria. A pesar de ello, los casos todavía no se declaran de forma sistemática.

Respecto a la situación en el mundo, la OMS incluyó cryptosporidiosis en el año 2004 en la iniciativa de “Enfermedades tropicales desatendidas” (Neglected Tropical Diseases - NTD).

Ciclo de vida y morfología

Cryptosporidium spp. tiene un ciclo monóxeno, lo que significa que todo su ciclo evolutivo se cumple en el mismo hospedador. En el hospedador, *Cryptosporidium* se encuentra dentro de las vacuolas parasitóforas en la capa de microvellosidades de las células epiteliales (Figura 1)

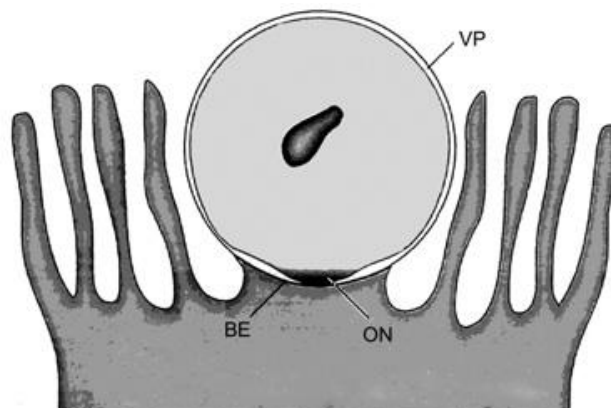


Figura.1. Localización de *Cryptosporidium* en la célula hospedadora (VP = Vacuola Parasitófora; BE = Banda Electrónica Densa; ON = Organela Nutricional)
(Sanz Pérez, 2010).

El ciclo de *Cryptosporidium* tiene dos fases: fase asexual (merogonia) y fase sexual (esporogonia). La fase infectante del parásito son ooquistes que contienen dentro 4 esporozoitos sin pared.

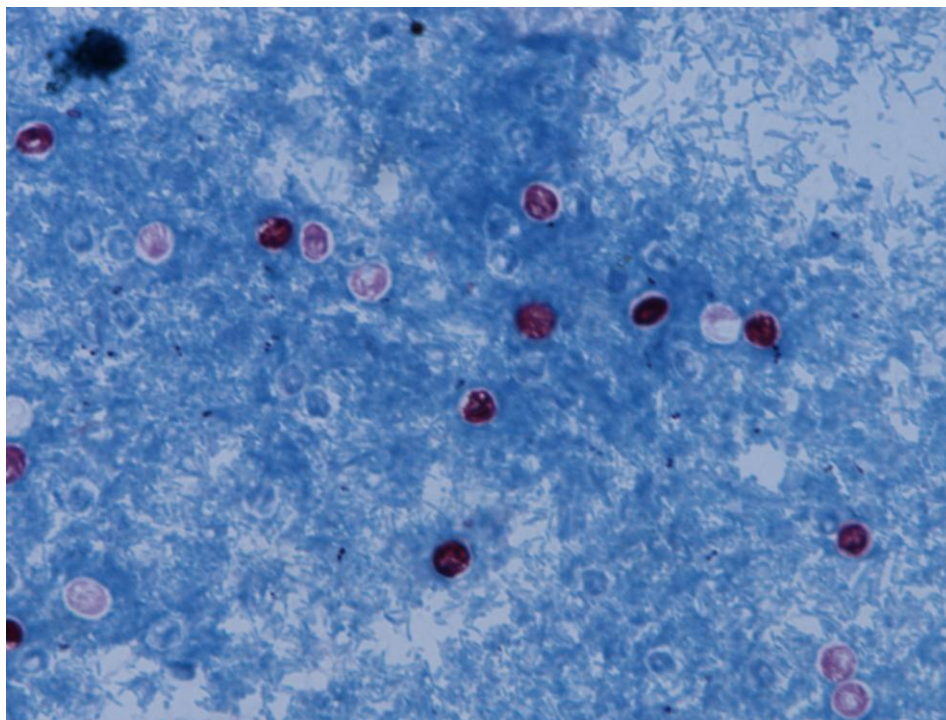


Figura 2. Ooquistes de *Cryptosporidium hominis* teñidos con la técnica Zielh Neelsen modificada observadas con microscopio óptico a 100x. (Fotografía propia)

Los ooquistes son ovales o esféricos y miden entre 4 y 6 μm (Figura 2). Los ooquistes son muy resistentes y pueden sobrevivir mucho tiempo fuera del hospedador. Si se mantienen en ambiente húmedo y a temperatura entre 0 y 20°C pueden ser infecciosos durante al menos 6 meses. A temperatura de -20°C o menos su viabilidad disminuye. Los ooquistes son también sensibles al peróxido de hidrógeno, al ozono y a la radiación ultravioleta, pero sobreviven al cloro y muchos más desinfectantes del mercado. Por lo tanto son muy infectantes especialmente a través de las piscinas públicas y privadas donde normalmente se utiliza los desinfectantes a base de cloro.

Los esporozoitos miden entre 4,5 y 7,9 μm (http://www.ispch.cl/lab_sal/parasitologia/control_subpro.html) y tienen forma semilunar. Cada uno tiene ocho cromosomas.

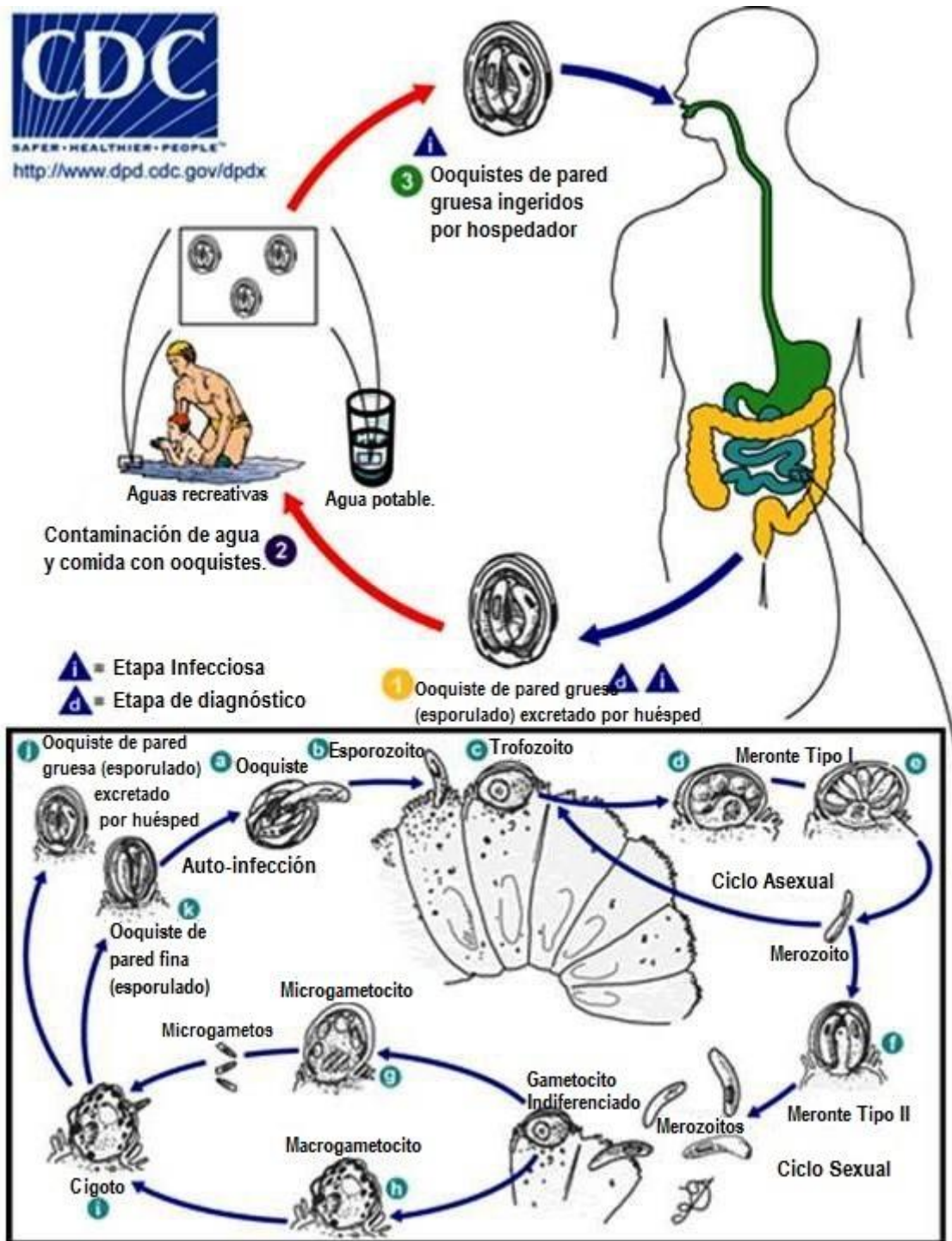


Figura 3: Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp (<http://www.dpd.cdc.gov> modificado).

Al ingerir los ooquistes empieza la fase endógena del parásito. Los ooquistes son resistentes al pH ácido del estómago y por eso el desenquistamiento ocurre en el intestino superior donde las enzimas pancreáticas y sales biliares debilitan la pared del ooquiste. En consecuencia, la pared del ooquiste se abre y los cuatro esporozoitos infectantes salen y parasitan las células epiteliales del tracto digestivo, donde quedan englobados en una vacuola parasitófora dentro de las células apicales de las microvellosidades, justo debajo de la membrana celular (es una ubicación intracelular y extracitoplasmática) (Figura 3: b, c). Es allí donde los esporozoitos se diferencian a trofozoitos unicelulares y luego pasan la fase merogonia (esquizogonia) (Figura 3: d, e, f). Los trofozoitos se multiplican asexualmente y forman los merontes tipo I (células con ocho merozoitos). Estos merontes después de madurar son liberados al intestino y pueden seguir dos vías. Algunos invaden otras células epiteliales y vuelven a pasar por el mismo ciclo de división asexual dando lugar a otros merontes tipo I. Otros se dividen asexualmente dos veces más y dan lugar a los merontes tipo II inmaduros, que después de madurar se convierten en merozoitos tipo II. Estos, después de su liberación al tracto intestinal, invaden células epiteliales y pasan en ellas la fase sexual de su desarrollo (gametogonia). Mediante diferenciación sexual forman microgametocitos (masculinos) y macrogametocitos (femeninos). Los microgametos, después de fertilizar al macrogametocito, dan lugar a un cigoto (Figura 3: i). El cigoto pasa por un desarrollo asexual (esporogonia) que da lugar a los ooquistes esporulados. La mayoría de los ooquistes forma la pared gruesa y resistente y son expulsados al exterior con las heces para parasitar a otros hospedadores (Figura 3: j). El resto de ooquistes (alrededor de 20%) (Hernández, 2001) desarrollan una pared delgada (Figura 3: k) que se puede romper fácilmente y en consecuencia se liberan los 4 esporozoítos que vuelven a invadir las células epiteliales del mismo hospedador iniciando un ciclo nuevo.

El ciclo del parásito puede completarse en 2 días. La infección puede durar unos días o meses dependiendo de la inmunidad del paciente. El período entre infección y liberación de nuevos ooquistes dura de 2 a 14 días en la mayoría de las especies (O'Donoghue, 1995).

Clasificación taxonómica

El género *Cryptosporidium* fue establecido en 1910 por Edward Ernest Tyzzer, tras encontrar ooquistes de la especie *Cryptosporidium muris* en un ratón.

Hoy en día la clasificación taxonómica sitúa *Cryptosporidium* spp. en el phylum *Apicomplexa* y familia *Cryptosporidiidae*:

Reino: **PROTISTA**

Filo: **Apicomplexa**

Clase: **Conoidasida**

Subclase: **Coccidiasina**

Orden: **Eucoccidiorida**

Suborden: **Eimeriorina**

Familia: **Cryptosporidiidae**

Género: ***Cryptosporidium***

Dentro del género se ha diferenciado 26 especies de los cuales por lo menos 9 (aparte de *C. hominis* y *C. parvum*) son capaces de infectar a los humanos (Navarro-i-Martinez et al., 2012; Chalmers and Katzer, 2013). Las especies más comunes y sus hospedadores aparecen en la tabla 1, en la que se han subrayado las especies que se han encontrado infectando a los humanos (Navarro i Martinez et al., 2012) (Tabla 1)

Tabla 1. Especies de *Cryptosporidium*, sus hospedadores y sitios de infección (Sanz Pérez, 2010; Zanaro and Garbossa, 2008; Fayer and Xiao, 2008; Fayer et al., 2010).

ESPECIE	HOSPEDADOR	SITIO DE INFECCIÓN
<u><i>C. parvum</i></u>	Ratón común, Vacunos, Humanos, Cerdos, Ovejas, Cabras, Caballos	Intestino delgado
<u><i>C. hominis</i></u>	Humanos, Monos	Intestino delgado
<u><i>C. muris</i></u>	Humanos, Roedores	Estómago
<u><i>C. meleagridis</i></u>	Humanos, Pavos	Intestino delgado
<i>C. baileyi</i>	Gallinas, Pavos	Tráquea, bolsa de Fabricio, cloaca
<i>C. serpentis</i>	Serpientes, Lagartijas	Estómago
<u><i>C. suis</i></u>	Cerdos	Intestino delgado
<i>C. wairi</i>	Cobayos	Intestino delgado
<u><i>C. felis</i></u>	Gatos, Humanos	Intestino delgado
<u><i>C. canis</i></u>	Caninos, Humanos	Intestino delgado
<u><i>C. andersoni</i></u>	Vacunos	Estómago
<i>C. bovis</i>	Bovinos	Intestino delgado
<u><i>C. ubiquitum</i></u> (Genotipo cervino)	Ovejas y otros animales, Humanos	Intestino delgado
<i>C. galli</i>	Gallo	Estómago
<u><i>C. cuniculus</i></u>	Conejos	Intestino
<u><i>C. genotipo de mono</i></u>	Monos	Intestino

Epidemiología

Hasta la fecha, se han identificado 26 especies (Navarro i Martinez et al., 2012) y más de 40 genotipos de *Cryptosporidium* spp. (Desai et al., 2012). En el 90 % de las infecciones que se producen en humanos se encuentran implicados *C. hominis* y *C. parvum* seguidos por *C. meleagridis*, *C. felis* y *C. canis*. (Xiao 2010). *C. hominis* es una especie antroponótica que infecta principalmente humanos, mientras que *C. parvum*, siendo especie zoonótica, infecta tanto humanos como animales.

La cryptosporidiosis es una zoonosis de transmisión feco-oral, siendo más frecuente en niños (especialmente los más pequeños, hasta 2 años) y personas con sistema inmunitario debilitado. Es una enfermedad autolimitada en pacientes inmunocompetentes pero puede llegar a ser muy peligrosa incluso letal en personas inmunosuprimidas.

El pequeño tamaño de los ooquistes y su resistencia al cloro, frío y calor facilitan su transmisión a través del agua. Los ooquistes solo se destruyen a temperaturas de -18 °C durante min 24 horas y a más de 65°C durante al menos 30 minutos. En cuanto a los agentes químicos los que pueden llegar a ser eficaces para destruir los ooquistes son el hidróxido de amonio (al 5 por 100) y el formaldehído (al 10 por 100) (Barco et al., 1991).

Los más expuestos a la infección son personas que viven en el mismo hogar que los portadores de *Cryptosporidium*, parejas sexuales de los infectados, trabajadores de guarderías, centros de salud (los que tienen contacto con pacientes con parásitos), los viajeros a los sitios con más riesgo de infección (que se contagian principalmente a través de aguas de ríos y residuales contaminadas) y los usuarios de las piscinas públicas, los niños que se agrupan en colegios, guarderías, etc. y todas aquellas circunstancia en que se dan agrupamientos de personas, ya que se favorece la transmisión persona-persona.

En los países en desarrollo, la cryptosporidiosis es la causante de la mayoría de los casos de diarreas en los niños que muchas veces va acompañada de vómitos y deshidratación. La cryptosporidiosis en niños pequeños puede provocar deterioro en el

crecimiento y aptitud física (Desai et al., 2012). En los países de baja renta, la infección por *Cryptosporidium* es mucho más frecuente que en los países desarrollados. En el último estudio epidemiológico de Kotloff et al. del año 2013 se investiga la causa y efecto de diarrea en 22.000 niños (menores de 5 años) en países de África, tales como Kenia, Mali, Mozambique, Gambia y de Asia (Bangladesh, India y Pakistán) (Kotloff et al., 2013). *Cryptosporidium* spp. resultó ser la segunda causa más común de diarrea en niños de 0 a 11 meses y tercera en niños de 12 a 23 meses de edad. (Kotloff et al., 2013). Globalmente se estima que la cryptosporidiosis es responsable de la 30-50% de las muertes en niños menores de 5 años y la segunda causa más común de diarrea y muerte en niños después del rotavirus (Ryan and Hijjawi 2015). Muchas veces cryptosporidiosis aparece como la co-infección con VIH. En los pacientes con SIDA la prevalencia de la cryptosporidiosis es del 14% en los países desarrollados y del 24% en los países en desarrollo (Coco et al., 2009).

En cuanto a la epidemiología molecular de *Cryptosporidium* spp. el método más usado para identificar los subtipos es el basado en la secuencia parcial de la glicoproteína polimórfica expresada en la superficie del esporozoíto (GP 60). Usando este método y la nomenclatura basada en el número de las repeticiones de trinucleótidos que codifican serina (TCA, TCG, TCT) (Sulaiman et al., 2005), hasta la fecha se han descrito varias familias de subtipos en humanos y animales. En humanos se han visto las siguientes familias de subtipos: 6 de *C. hominis* (Ia, Ib, Id, Ie, If, Ig y Ih (Molloy et al., 2010)), 11 de *C. parvum* (2 zoonóticos: IIa y IIc y 10 no-zoonóticos: IIb, IIc, IId, IIe, IIg, IIh, IIf, IIk, III y IIIm (Molloy et al., 2010)) (Hira et al., 2011), 6 de *C. meleagridis* (IIIa-IIIg) (Hijjawi et al., 2010), 6 de *C. fayeri* (IVa, IVb, IVc, IVd, IVe, IVf) (Power et al., 2009) y 6 de *C. ubiquitum* (XIIa, XIIb, XIIc, XIId, XIIf, XIIg) (Li et al., 2014).

Los subtipos de la familia Ia se han identificado en algunos países como Perú (Cama et al. 2008), China (Feng et al 2009), Australia (Jex et al. 2008), Malaysia (Lim et al 2011), Bangladesh (Hira et al 2011) y USA (Feng et al 2013). En Europa se ha encontrado sólo en Portugal (Alves et al., 2006).

En Europa y Australia la familia de subtipos que predomina es el Ib, destacando el subtipo IbA10G2R2, que además es el causante más frecuente de brotes de cryptosporidiosis en Europa (Xiao 2010).

Los subtipos Id y Ie también se encuentran en pacientes en los países y regiones en desarrollo, pero se observa diferencia entre ellos. Por ejemplo, la familia Ie se ha visto en los niños en África del Sur mientras que en Jamaica casi todas infecciones son causadas por subtipo de la familia Ib (Xiao 2010). Aparte de subtipo Ie hay también publicaciones de otros subtipos de *C. hominis* en África (Uganda, Malawi y África del Sur), tales como Ia, Ib y Id (Molloy et al., 2010)

En cuanto a los subtipos de *C. parvum* un estudio de Molloy et al., del año 2010 describió en África la presencia de subtipos IIa, IIc, IId y Ili, de los cuales los más común eran IIa y IIc (Molloy et al., 2010). El subtipo IIa es también el más común de todos los subtipos de *C. parvum* que se detectan en humanos en todo el mundo. Aparece en 57.8% de los casos y se ha visto en 26 países (Valenzuela et al., 2014)

En España, las 3 publicaciones más recientes de cryptosporidiosis en humanos son del año 2015. Uno describe un brote de cryptosporidiosis en una guardería de Granada que afectó a 7 niños menores de 4 años (Goñi et al., 2015), el segundo casos de infección por *Cryptosporidium* spp. en Galicia en los años 2000-2008 (Abal-Fabeiro et al., 2015) y el último describe 44 casos de cryptosporidiosis en niños de Zaragoza en el año 2010. Otro artículo anterior a los antes mencionados es del año 2012 y describe 77 casos de cryptosporidiosis, 17 de Madrid y 60 de La Coruña (Navarro i Martinez et al., 2012). La mayoría de las especies encontradas en dicho estudio fueron *C. parvum* y *C. hominis* (40 y 30 muestras respectivamente) y una de *C. meleagridis*.

Los estudios más reciente en la comunidad del Aragón son del año 2015 y 2012. El primero describe cryptosporidiosis en la población de niños en Zaragoza (Ramo et al., 2015) y el segundo dos casos de especies zoonóticas encontrados en pacientes de Zaragoza y León (Cieloszyk et al., 2012).

En la comunidad de Aragón, el estudio epidemiológico más amplio realizado hasta la fecha, caracteriza las especies identificadas en 105 casos de cryptosporidiosis (Llorente et al., 2007). La mayor prevalencia en el estudio presentaron *C. parvum* (34/105) y *C. hominis* (69/105) (32% y 64% respectivamente), no obstante en dos pacientes se encontraron *C. meleagridis* y *C. felis*. Dicho estudio describe además la distribución de las especies de *Cryptosporidium* en zonas rurales y urbanas donde *C.*

parvum resultó ser más frecuente en niños de áreas rurales (43%) que áreas urbanas (19%).

Las especies identificadas como zoonóticas en Aragón fueron de *C. felis* y *C. meleagridis*. El caso de *C. felis* correspondía a un niño adoptado de 4 años, procedente de un orfanato de Calcuta. El niño al llegar presentaba diarrea, en el coprocultivo no crecieron bacterias enteropatógenas, en el estudio parasitológico se observaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. que, por técnicas de biología molecular, se identificaron como *C. felis*, mientras que el caso de *C. meleagridis* correspondía a un niño de un año de edad que vivía entre los ambientes rural y urbano (Llorente et al., 2006).

Mecanismos de transmisión

La transmisión de *Cryptosporidium* spp. puede ser feco-oral, por contacto directo con hospedador o por ingestión de alimentos o agua contaminados. También es posible, pero con menos frecuencia la transmisión por inhalación (con aerosoles o por toser o estornudar), o por contacto sexual.

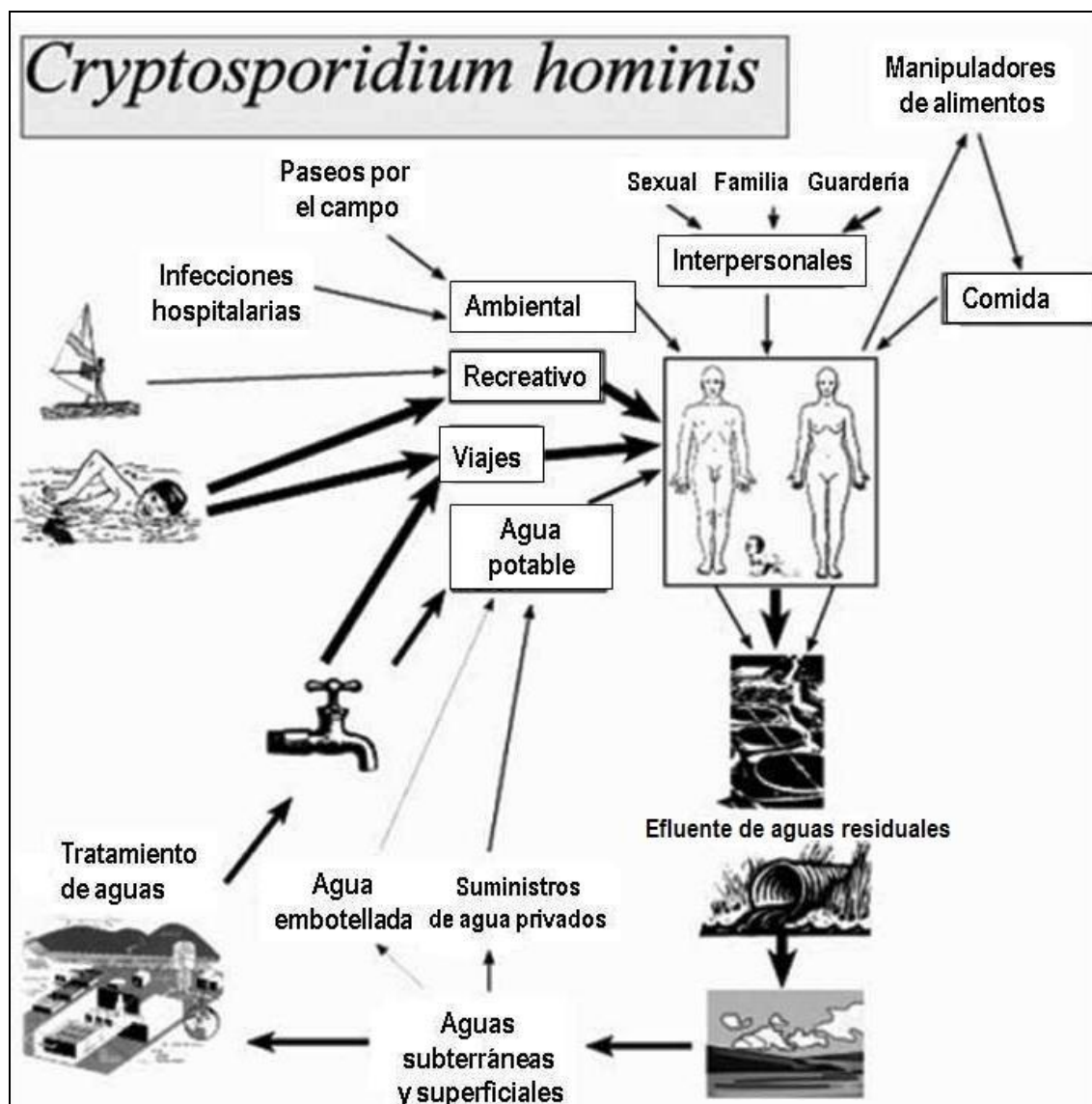


Figura 4: Las rutas de transmisión de *C. hominis* (Fayer and Xiao, 2008 modificado).

Para humanos la fuente de contagio más frecuente es el agua, porque en ella los ooquistes pueden permanecer viables durante 140 días (Pérez 2010). Como fuente de agua se entiende agua potable (del grifo, de botella, los suministros privados de aguas), agua recreacional de piscinas, lagos, ríos (Figura 4). El contagio persona-persona es también bastante común, especialmente por contacto entre familiares o cuidadores. Otras fuentes puede ser comida manipulada por personas infectadas o lavada con agua infectada o la leche mal pasteurizada. Los alimentos, tales como vegetales de consumo crudo, también se pueden contaminar por regar las plantas con

agua contaminada. Hay estudios que revelan que la mosca *Milichiidae* y otros insectos que se ven atraídos por las heces, pueden servir como vectores de transmisión tanto de *C. hominis* como de *C. parvum* para contaminar comidas (pasar ooquistes de los heces a la comida) (Szostakowska et al., 2004). También en otro estudio se ha demostrado que la mosca doméstica puede transportar ooquistes de *Cryptosporidium* (Clavel et al. 2002).

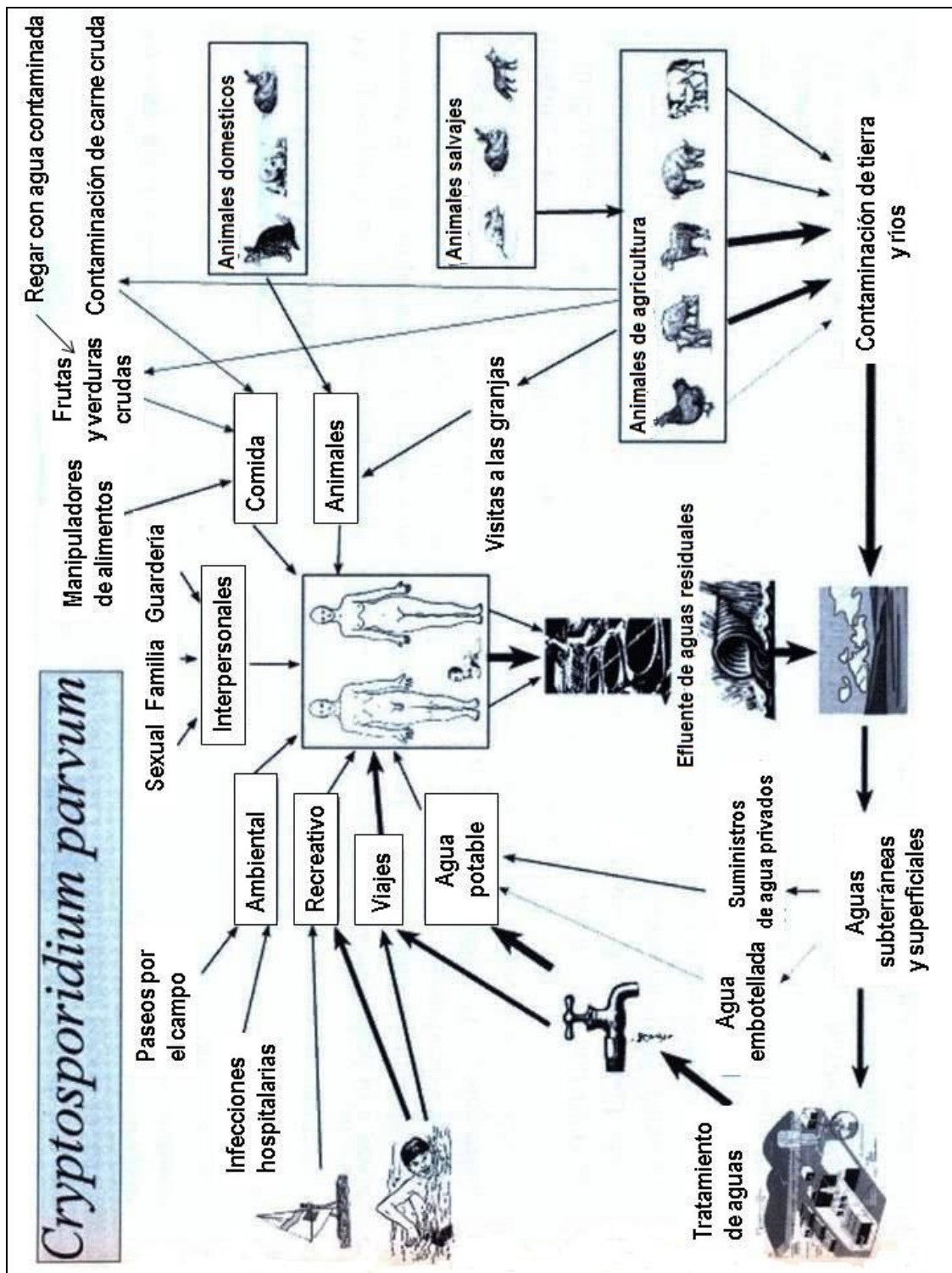


Figura 5: Las rutas de transmisión de *C. parvum* (Fayer and Xiao, 2008 modificado).

Cryptosporidium parvum aparte de las fuentes de contagio previamente descritas es también de transmisión zoonótica (de animal a persona). Este parásito se transmite por el contacto con heces de animales de compañía, de granja o salvajes que estén infectados.

Síntomas de la infección

El síntoma más común de cryptosporidiosis es diarrea profusa y acuosa y muchas veces con moco. En personas inmunocompetentes la diarrea es de carácter autolimitado. Otros síntomas que puedan aparecer son: dolor abdominal, fiebre, vómitos, fatiga y falta de apetito. La duración e intensidad de los síntomas depende bastante del sistema inmunitario del paciente y oscila entre 1 y 3 semanas (O'Donoghue, 1995). La eliminación de ooquistes persiste de 1 a 4 semanas. En personas inmunodeprimidas, la cryptosporidiosis puede dar lugar a una diarrea profusa y prolongada de larga duración, que no tratada puede incluso provocar muerte del paciente. En pacientes con VIH aparece con frecuencia también la infección de vías biliares. En pacientes inmunodeprimidos se ha visto también infección broncopulmonar que probablemente se debe a aspiración de vómito o regurgitado (Clavel et al., 1996). La infección por *Cryptosporidium* spp. es muy peligrosa para las personas con déficit inmunitario, por la ausencia de la terapia efectiva para este parásito.

En los países en desarrollo la cryptosporidiosis es una de las causas más frecuentes de diarreas en niños. Los niños malnutridos son más propensos para la infección. Los riesgos de adquirir cryptosporidiosis por los niños aumentan en situaciones de bajo estatus socioeconómico, malas condiciones en la vivienda, menores de 2 años, presencia en el entorno los animales como cerdos, gatos y perros, beber agua no potable, bajo peso de nacimiento y falta de amamantamiento (Desai et al., 2012).

Tratamiento

Las personas inmunocompetentes suelen curarse de forma espontánea después de un periodo de unas 3 semanas tratando las diarreas y reemplazando líquidos y electrolitos, en caso de necesidad.

Ha habido numerosos intentos para descubrir un tratamiento eficaz para la cryptosporidiosis, especialmente para los pacientes con VIH positivo (Desai et al., 2012). Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado ningún tratamiento con mucha eficacia. Hay algunos antibióticos que parecen ser prometedores en la terapia frente a *Cryptosporidium* spp. Uno de ellos es la nitazoxanida (NTZ). Es un fármaco, derivado sintético de la sialicamida, usado para tratar diarrea provocada por *Cryptosporidium* y *Giardia*. En noviembre 2002 FDA (Food and Drug Administration) lo aprobó para uso en niños de 1 a 11 años y en junio de 2004 amplió su uso para mayores de 11 años y adultos. La mayor ventaja del tratamiento con nitazoxanida es su eficacia contra la diarrea (72%-88%) y particularmente contra *Cryptosporidium* (60-75%). La diarrea cesa después de los 5 días de tratamiento en el 80% de los pacientes. Otra ventaja de este medicamento es su bajo coste (CDC). Las desventajas son los probables efectos secundarios, tales como dolor abdominal, dolor de cabeza, náuseas o vómito. Aparte de nitazoxanida, se utiliza también paromomicina, que tiene una actividad profiláctica y terapéutica elevada, pero suelen aparecer recaídas tras finalizar el tratamiento. Otros compuestos utilizados son: azitromicina que tiene un efecto limitado, espiramicina con poca actividad y elevada toxicidad y ciclodextrinas que tienen actividad profiláctica y terapéutica elevada.

Para las personas inmunodeprimidas el mejor tratamiento parece ser el uso de los medicamentos antirretrovirales (ARV), que se utilizan para tratar la co-infección con el VIH (Pozio and Morales, 2005). El tratamiento con estos medicamentos puede aumentar el recuento de células CD4. En muchos pacientes VIH positivos con cryptosporidiosis este tratamiento ha dado buenos resultados. También se pueden usar antibióticos para tratar directamente la cryptosporidiosis, pero no funcionan de manera sistemática a no ser que sean combinados con los ARV.

En realidad existen tres perspectivas para el tratamiento de la cryptosporidiosis: tratar la infección, controlar la diarrea y corregir la pérdida de peso.

Profilaxis y prevención

La prevención más efectiva de criptosporidiosis es evitar las fuentes de infección y prevenir la transmisión de ooquistes. Esto incluye mantener la higiene personal y de los alimentos. Es preciso lavarse las manos con frecuencia, especialmente después de ir al baño, al cambiar el pañal de bebés, limpiar la bandeja higiénica de los gatos o recoger excrementos de perros. Los animales de compañía deben de pasar revisiones veterinarias periódicas (Del Coco et al., 2009). La cloración y los métodos de desinfección habitualmente utilizados en la potabilización de aguas no eliminan los ooquistes por lo que si se sospecha posibles contaminaciones del agua, es recomendable tomar agua embotellada o hervida y lavar bien las frutas y verduras. Así mismo, los vegetales de consumo crudo no se deben de regar con aguas que no reúnan las garantías necesarias y antes de utilizar como abonos los fangos de depuradora es preciso llevar a cabo su higienización controlada. Las personas inmunosuprimidas deberían evitar contacto con agua no potable. Las aguas recreacionales deben de ser monitorizadas con frecuencia ya que es una fuente de contagio muy frecuente (Hlavsa et al., 2015). Por eso se debería uno abstener de usar piscinas públicas y otros fuentes de agua recreacional presentando diarrea, y tampoco usarlo durante los dos semanas después de desaparición de síntomas en el caso de infección y tratamiento. De la misma forma, cuando un niño está afectado por *Cryptosporidium* es preciso no llevarlo a la guardería o al colegio hasta que cese la diarrea.

GIARDIA DUODENALIS Y GIARDIOSIS

Breve historia

Giardia duodenalis, *lamblia* o *intestinalis* es un microorganismo de *phylum Metamonadina*, identificado por primera vez por Antonie van Leeuwenhoek a finales de 1600 cuando observaba al microscopio su propio material fecal con diarrea (Dobell, 1920). Posteriormente *Giardia* fue descrita por Lambl a los 1800 como *Cercomonas intestinalis* (Elmendorf et al., 2003). Fue Kunstler, en 1883, el que aconsejó el nombre *Giardia* al género, en honor a su profesor A. M. Giard de París, cuando lo encontró en renacuajos. Posteriormente, en 1915, Stiles lo llamó *Giardia lamblia* en conmemoración para el profesor Lambl, que la redescubrió y proporcionó su primera descripción completa (Rajurkar et al., 2012). El nombre ``duodenalis`` fue proporcionado por Davaine en 1875, cuando encontró el parásito en heces de un conejo y lo denominó *Hexamita duodenalis*.

Actualmente los dos nombres *Giardia lamblia* y *Giardia duodenalis* se usan en literatura.

Distribución (Epidemiología)

Giardiosis es una infección cosmopolita que afecta a humanos en todo el mundo. En algunas zonas geográficas es endémica, afectando a población infantil con frecuentes reinfecciones, pudiendo llegar a ser epidémica si afecta a comunidades o viajeros que visitan zonas endémicas (Soriano, 2002). En el año 2012, se estima que la infección por *Giardia lamblia* alcanzó los 200.000.000 individuos infectados en el mundo, de los cuales 500.000 sufrieron la forma sintomática de la enfermedad. También es la causa en el 20% de los casos de diarrea que se dan en países en vías de desarrollo y un 3-7 % en países desarrollados (AMSE, 2014). La giardiosis es más frecuente en niños que en adultos, aunque puede afectar a población de todas las edades.

Hay un riesgo significativo de contagio por *Giardia* para los viajeros a las zonas endémicas, que tienen contacto con aguas recreacionales, aguas de piscinas y aguas potables contaminadas (WHO, 2014).

Ciclo de vida y morfología

Giardia lamblia es un parásito que tiene dos estadios morfológicos: trofozoito y quiste.

Trofozoito es la forma vegetativa que habita en el intestino delgado y es responsable de las manifestaciones clínicas (Soriano, 2002).

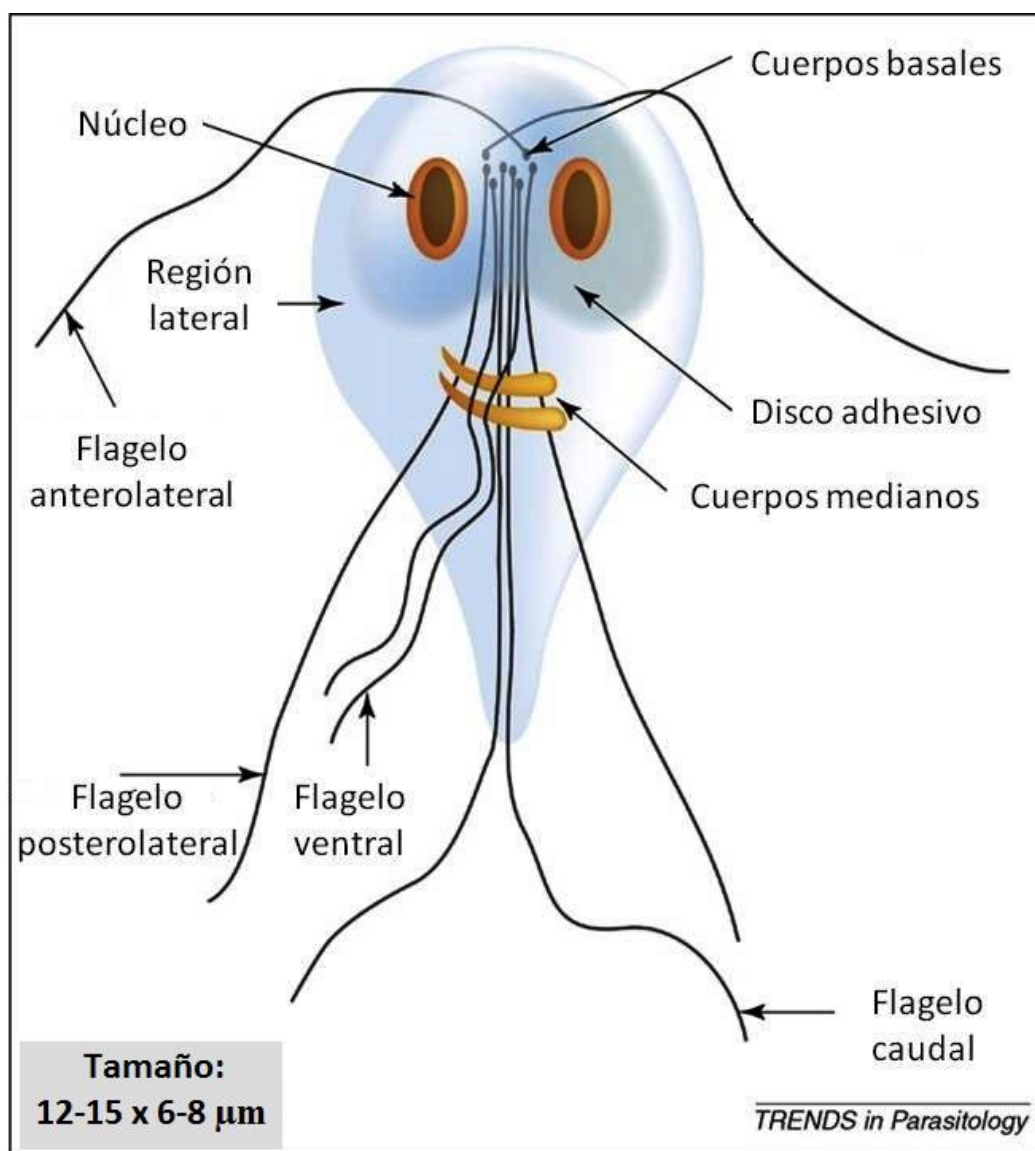


Figura 6: Morfología del trofozoito de *Giardia duodenalis* (Monis et al., 2009 - modificado).

Los dos núcleos ovoides que están situados simétricamente a cada lado de la línea media del trofozoito poseen un cariosoma central sin cromatina periférica. Son casi idénticos en apariencia y se replican casi al mismo tiempo. Ambos son transicionalmente activos y poseen la misma cantidad de DNA, de genes y de cromosomas (Adam, 2001).

El disco adhesivo (o de succión) es una estructura cóncava de 0,4µm, formada por microtúbulos y microcintas. Esta estructura es imprescindible para que *Giardia* pueda permanecer en el intestino delgado y ejercer su poder patógeno (Elmendorf et al., 2003). Contiene proteínas contráctiles que permiten la adherencia del trofozoito al epitelio intestinal.

Los cuerpos medianos están localizados en la línea media del trofozoito. Están formados por microtúbulos con forma curvada. Actúan como sitio de ensamblaje de los microtúbulos para incorporarlos en el disco ventral.

El trofozoito posee cuatro pares de flagelos que nacen de los cuerpos basales situados entre los dos núcleos que permiten la movilidad del trofozoito (blefaroblastos).



Figura 7: Trofozoito de *Giardia duodenalis*. (<http://www.dpd.cdc.gov>)

Quiste es la forma de resistencia y la forma infecciosa de *Giardia duodenalis*. Tiene una forma oval o redondeada y tamaño de 8-12 µm de largo y 7-10 µm de ancho. Posee

dos o cuatro núcleos, ocho axonemas de los flagelos, cuerpos medianos, fragmentos de microtúbulos del disco ventral, numerosas vacuolas y ribosomas (Adam, 1991). La pared de quiste compuesta de quitina tiene 0,3 μm de grosor. Es resistente a las condiciones ambientales permaneciendo viable hasta 16 días a 4°C. Se destruyen a temperaturas mayores de 50°C y más. Es resistente a concentraciones de cloro usadas normalmente para la depuración del agua de beber (Clavel et al., 1990).



Figura 8: Quiste de *Giardia duodenalis* (<http://www.dpd.cdc.gov>)

Ciclo de vida

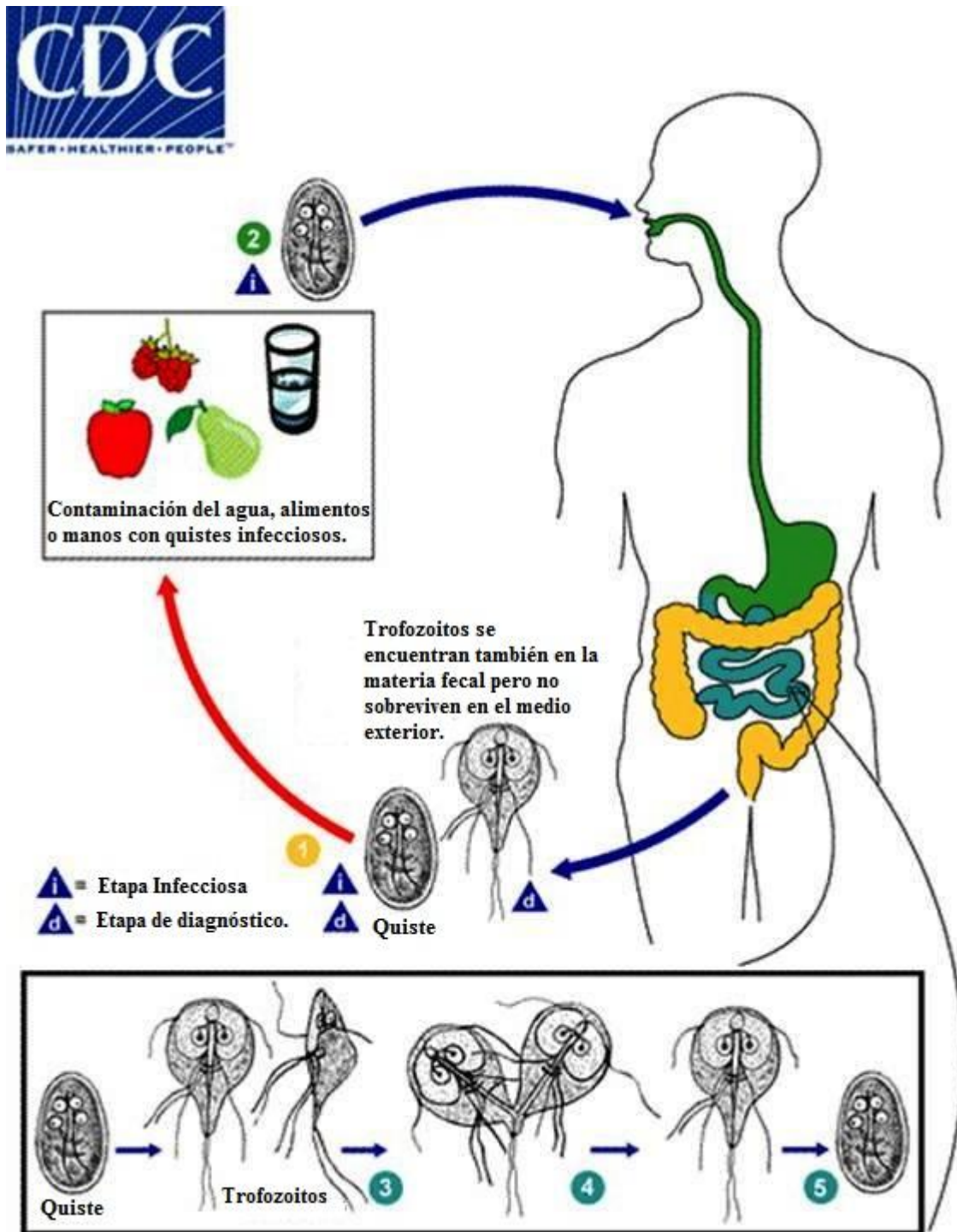


Figura 9: Ciclo de vida de *Giardia duodenalis* (<http://www.dpd.cdc.gov> modificado)

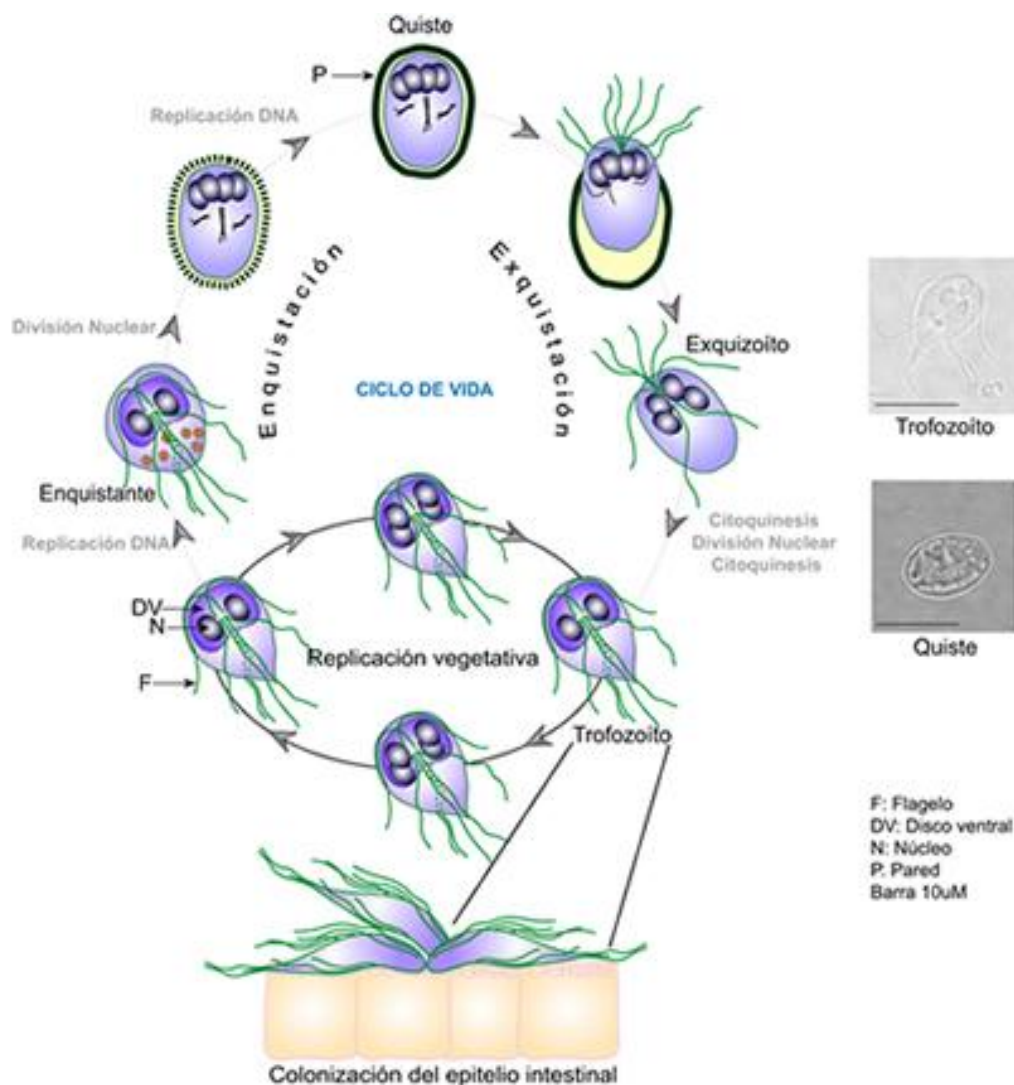


Figura 10. Ciclo de vida de *Giardia duodenalis* (<http://www.unal.edu.co/ins-libbiqUN/modelo1.html>)

Al ingerir los quistes con agua o comida contaminada o a través de la ruta feco-oral o manos contaminadas ocurre la infección (Figura 9, 2). La dosis infectante es muy baja de 10 a 100 quistes (Rendtorff, 1954). Gracias al bajo pH del estómago y la actividad de las proteasas pancreáticas en el intestino delgado ocurre el desenquistamiento. Del quiste sale un trofozoito irregular en forma de una célula ovoide con dos flagelos y que contiene cuatro núcleos. Posteriormente, el proceso de citodiferenciación da lugar a dos trofozoitos hijos (Figura 10), que gracias a los movimientos de los flagelos se dirigen a la superficie de los microvellosidades donde se adhieren al epitelio intestinal. Cuando los trofozoitos abandonan la fijación se pueden multiplicar por fisión binaria (Figura 9, 4) o pueden ser arrastrados hacia las partes bajas

del intestino donde ocurre el enquistamiento (Figura 9, 5). Los quistes son eliminados con las heces. En el caso de aumento del tránsito intestinal también se pueden eliminar trofozoítos.

Clasificación taxonómica

La taxonomía tradicional según Levine de 1980 basada en la morfología sitúa de *Giardia* spp como protozoo flagelado en el phylum *Sarcomastigophora* y es la siguiente:

Reino: ***Protozoa***

Phylum: ***Sarcomastigophora***

Subphylum: ***Mastigophora (Flagellata)***

Clase: ***Zoomastigophorea***

Orden: ***Diplomonadida***

Familia: ***Hexamitidae***

Género: ***Giardia***

Especie: ***Giardia lamblia***
(intestinalis, duodenalis)

Sin embargo, durante los últimos 30 años esta taxonomía ha variado, como consecuencia de los estudios moleculares que se han ido realizando y de otros estudios genéticos, estructurales y bioquímicos, que han dado lugar a la creación del *subreino Archezoa*, en el que se encuentran organismos supuestamente premitocondriales (*Giardia* y *Trichomonas*) (Plutzer et al., 2010). A base de estos nuevos datos la taxonomía de *Giardia* spp es la siguiente (Calavier-Smith, 2003):

Reino: ***Protozoa***

Phylum: ***Metamonada***

Subphylum: ***Trichozoa***

Superclase: ***Eopharyngia***

Clase: ***Trepomonadea***

Subclase: ***Diplozoa***

Orden: ***Giardiida***

Familia: ***Giardidae***

Hasta la fecha se han descrito 11 especies de *Giardia* basándose en las características morfológicas de los trofozoítos. Seis de ellos (*G. aguilis*, *G. ardeae*, *G. psittaci*, *G. muris*, *G. microti* y *G. duodenalis*) se han distinguido en función de la morfología del trofozoíto y el cuerpo mediano, mediante microscopía óptica y electrónica (Plutzer et al., 2010).

Posteriormente, las técnicas moleculares han demostrado una alta variedad genética, habiéndose diferenciado 7 assemblages denominados: A, B, C, D, E, F y G. (Monis et al., 2009).

En la Tabla 2 se muestran todas las especies, genotipos, hospedadores y características morfológicas de *Giardia* spp.

El assemblage A se ha subdividido en AI que se ha encontrado en humanos y otros mamíferos, assemblage AII que es exclusivo de los humanos. El assemblage B ha sido subdividido en BIII y BIV (Torres-Romero et al., 2014). Últimamente, se van encontrando más genotipos capaces de infectar personas, como por ejemplo el genotipo E, cuyo hospedador inicial era solo el ganado pero se ha encontrado en humanos en Egipto, probablemente como consecuencia de una transmisión zoonótica (Foronda et al., 2008).

Tabla 2. Especies, genotipos y hospedadores del genero *Giardia* spp. (Monis et al., 2009 - modificado).

Especie	Genotipo	Hospedador	Trofozoitos		
			Características morfológicas	Largura (µm)	Anchura (µm)
<i>G. duodenalis</i>	AI	Humanos, primates, perros, gatos, ganado, roedores y otros animales salvajes	Forma de pera con cuerpo mediano en forma de garfio.	12 – 15	6 – 8
	AII	Humanos			
<i>G. enterica</i>	B	Humanos, primates, perros y algunos otros animales salvajes	Forma de pera con cuerpo mediano en forma de garfio.	12 – 15	6 – 8
<i>G. agilis</i>	-	Anfibios	Largos, delgados con cuerpo mediano en forma de garrote.	20 – 30	4 – 5
<i>G. muris</i>	-	Roedores	Esféricos con cuerpos medianos esféricos y pequeños.	9 – 12	5 – 7
<i>G. psittaci</i>	-	Aves	Forma de pera, sin borde ventro-lateral. Cuerpos medianos con forma de garfio.	~14	~6
<i>G. ardeae</i>	-	Aves	Esféricos con muesca prominente en el disco ventral y flagelo caudal rudimentario. Cuerpos medianos desde redondo-ovalados hasta los con forma de garfio.	~10	~6,5
<i>G. microti</i>	-	Roedores	Parecidos a los de <i>G. duodenalis</i> . Los quistes maduros contienen los trofozoitos completamente diferenciados.	12 – 15	6 – 8
<i>G. canis</i>	C/D	Perros y otros caninos			
<i>G. bovis</i>	E	Ganado			
<i>G. cati</i>	F	Gatos			
<i>G. simondi</i>	G	Ratones			

Epidemiología molecular

En el estudio realizado en Suecia en año 2012, se estudiaron 200 aislamientos de *Giardia* procedentes de los humanos, lo que reveló que el 65% de los casos eran producidos por el assemblage B y solo 35% por assemblage A. Esta prevalencia del assemblage B en humanos también se ha visto en el resto del mundo excepto en algunas regiones de América del Sur y México (Jerlström-Hultqvist et al., 2010). En el mismo estudio de Suecia también han revelado que el assemblage B era más común en pacientes con resistencia al tratamiento (Jerlström-Hultqvist et al., 2010).

En otro estudio, realizado por Feng and Xiao en año 2011, en el que se analizaron 4000 aislamientos de *Giardia* de humanos, demuestra que assemblage B es más común que el assemblage A tanto en países desarrollados (1589 casos frente a 1096) como en los países en desarrollo (708 casos frente a 482). También se ha visto que subgrupo AII es un poco más frecuente en humanos que subgrupo AI. (Feng and Xiao 2011). Últimamente se ha identificado otro subtipo del assemblage A, el AIII el cual está asociado principalmente con animales ungulados salvajes (Feng and Xiao, 2011). En algunos otros países como México predomina el assemblage A, concretamente el AI (Torres-Romero et al., 2014).

En España los datos son limitados. Tan solo 326 aislados han sido caracterizados con la técnica del gen *tpi* en tres estudios independientes hasta el año 2012 (Sahagún et al., 2008; Goñi et al., 2010; Cardona et al., 2011) en los cuales se ha detectado los assemblages A y B con prevalencia más alta del B (56-87%) frente al subassemblage AII (29-40%) (Carmenta et al., 2012).

En el previo estudio en Zaragoza y León, España del año 2010 también se encontró la prevalencia mucho más alta del assemblage B que el A tanto en León como en Zaragoza. De hecho, en ninguna muestra apareció la infección solo con assemblage A. En unas pocas muestras se detectó la infección mixta AII+B (Goñi et al., 2010).

Hay autores que asocian la sintomatología con la infección con diferentes assemblages de *Giardia duodenalis*. Así en el estudio de Sahagun et al., del año 2008 las infecciones sintomáticas se asocian más al assemblage AII ya que se han visto en

67.4% de los pacientes infectados con este assemblage mientras en los pacientes con assemblage B solo en 42.6%. Resultados parecidos se han obtenido en otros estudios de Inglaterra y Bangladesh, sin embargo, hay estudios en el mundo que presentan resultados opuestos, sugiriendo una posible relación entre genotipo y su capacidad para resistir y sobrevivir en el medioambiente (Carmena et al., 2012).

Mecanismos de transmisión

El reservorio y fuente de infección de *Giardia* es el hombre (principalmente niños) enfermo o asintomático. Sin embargo, la infección por *Giardia* es también muy frecuente en animales domésticos, tales como perros, gatos, pájaros, caballos, cabras, ovejas, vacas, etc.) y mamíferos salvajes y aves (Soriano 2002).

Los potenciales mecanismos de transmisión incluyen: persona a persona, animal a animal, persona a animal y animal a persona (transmisión zoonótica), contaminación de aguas por personas y animales e infección de personas y animales a través de aguas de bebida, piscinas o aguas usadas para manipulación de alimentos (Figura 11) (Plutzer et al., 2010).



Figura 11. Los ciclos de transmisión de *Giardia duodenalis* (Thompson et al., 2004 - modificado)

Las personas más propensas a la infección son los niños menores de 10 años, personas inmunodeprimidas y los viajeros a zonas endémicas o epidémicas.

Mecanismos de patogenicidad

Los mecanismos que dañan la mucosa son los siguientes:

- El disco ventral, al actuar como ventosa por las proteínas contráctiles.
- La lectina de adhesión a la manosa puede contribuir al daño epitelial.
- Proteasas que rompen las uniones intercelulares del epitelio intestinal.
- Inducción de apoptosis de los enterocitos.

Moléculas liberadas por el parásito, con actividad proteolítica pueden inducir apoptosis. Hay pérdida de la función de barrera epitelial que va a dar lugar a malabsorción de nutrientes, sodio y agua e hipersecreción de Cl^- y deficiencia de disacaridasas.

Factores luminales:

- Los trofozoítos consumen sales biliares.

La disminución de sales biliares en intestino disminuye la actividad de la lipasa pancreática y dificulta la solubilización de las grasas, lo que contribuye a la malabsorción de las grasas.

En la infección por *Giardia*, como consecuencia de todos estos mecanismos, se produce:

- Atrofia de las vellocidades
- Acortamiento de las microvellosidades
- Reducción de la actividad de las disacaridasas (que descomponen los disacáridos en monosacáridos)
- Pérdida de la función de barrera epitelial
- Apoptosis de los enterocitos que da lugar a aumento de la permeabilidad intestinal
- Aumento de la permeabilidad intestinal por alteración de las uniones intercelulares de las células del epitelio intestinal.

Todas estas alteraciones pueden dar lugar a: diarrea, malabsorción y, en ocasiones, manifestaciones extraintestinales (Buret 2008; Soriano 2002).

Síntomas de la infección

Los síntomas de la infección por *Giardia* son muy variados. Dependen de la respuesta inmunitaria individual del organismo del hospedador y de factores propios del parásito. Las presentaciones clínicas de giardiasis pueden ser los siguientes:

Infección asintomática

Es la forma más común de la infección tanto en adultos como en niños. Es muy frecuente en áreas endémicas donde las reinfecciones son muy frecuentes. Se estima que alrededor de 60% de giardiasis ocurren de esta manera (Soriano, 2002).

Giardiasis aguda

Es la infección autolimitada de 2 a 4 semanas de duración. Se manifiesta con diarreas de heces pastosas, amarillentas, mucosas y grasosas, pérdida de peso, molestias abdominales, anorexia, náuseas, flatulencia, vómitos y esteatorrea. La giardiasis aguda ha sido estudiada en viajeros a zonas endémicas, los síntomas aparecen a los 3-20 días de la llegada.

Giardiasis crónica

En estos casos la diarrea con esteatorrea de heces abundantes, malolientes y grasosas persiste por mucho tiempo. Se producen trastornos en la absorción de grasas, proteínas, azúcares y vitaminas A, B12 y ácido fólico. La pérdida de peso se observa en 10-20% de los pacientes con este tipo de giardiasis. Se puede producir anemia por deficiencia de ácido fólico (Olivares et al., 2002).

Diagnóstico

El diagnóstico para *Giardia* se basa principalmente en la observación microscópica de trofozoítos y quistes del parásito en la muestra de heces e inmunocromatografía. Sin embargo, estos exámenes resultan ser de baja sensibilidad ya que no siempre detectan las infecciones con bajo número de parásitos (Cardona et al., 2014). En estos casos, las más convenientes son las técnicas basadas en la reacción en cadena de polimerasa porque son mucho más sensibles y detectan los parásitos en la muestra incluso hasta los 3 meses después de la finalización de tratamiento y confirmación de la falta de parásito por microscopía (Requena-Méndez et al., 2014).

Las técnicas de la PCR basadas en la amplificación de un fragmento del gen *tpi* y de la *beta giardina* son sin duda mucho más sensibles que las técnicas de microscopia e inmunocromatografía, sin embargo no suelen utilizarse en el diagnóstico común en los hospitales ya que son más caros y más largos que el examen microscópico (Molina et al., 2007). Además, no especifican la carga parasitaria en la muestra. Estas técnicas también conllevan problemas relacionados con la gran variabilidad de los genes de la *tpi* y *beta giardina* lo que puede dar lugar a baja sensibilidad de la PCR y a las posibles amplificaciones inespecíficas (Bertrand et al., 2005).

Tratamiento

Hay varios fármacos que se pueden usar para el tratamiento de giardiosis. Los más frecuentemente usados son nitroimidazoles (Metronidazol, Tinidazol y Ornidazol) y benzimidazoles (Albendazol, Mebendazol). También se pueden usar los derivados de acridina (Quinacrina) y furazolidona. En las mujeres embarazadas se usa Paromomicina. Sin embargo, como demuestra el estudio de Requena-Mendez et al., del año 2014 de Barcelona, estos medicamentos no siempre son efectivos. En dicho estudio se ha evaluado la infección por *Giardia* de una familia de 4 miembros (padres y 2 hijos adolescentes) que presentaron síntomas de infección por *Giardia* y posteriormente la infección se confirmó con análisis microscópico y PCR del gen *tpi*. Se aplicó el tratamiento primero con Tinidazol después del cual en uno de los hijos desaparecieron los síntomas y no presentó quistes en el examen microscópico. Sin embargo, el resto de la familia siguió con síntomas y todos seguían presentando quistes. Siguió el tratamiento de los 3 miembros de la familia con quinacrina ayudó a eliminar síntomas, no observándose quistes en el examen microscópico. Los padres seguían con tratamiento con Paromomicina al presentar quistes de *Entamoeba histolytica*. A pesar de los tratamientos y de la falta de quistes por visión microscópica los 3 miembros de la familia presentaban resultados positivos para *Giardia* con PCR del gen *tpi* hasta los 2 meses después de obtener resultado negativo por microscopia (Requena-Mendez et al., 2014). La primera opción en el tratamiento es el metronidazol, pero es un medicamento mutagénico y carcinogénico y por eso tiene que evitarse en el embarazo. También se han descrito casos de resistencia a este fármaco, como el caso de Valladolid de la niña de 23 meses adoptada, en la que se seguían observando quistes de *Giardia lamblia* en heces tras 4 ciclos de tratamiento con metronidazol, por lo que al final se administró el tratamiento con mepacrina con lo que se logró la remisión de síntomas y eliminación de quistes (Vega Gutiérrez et al., 2008).

OBJETIVOS

Objetivos generales

- ❖ Avanzar en el conocimiento de las poblaciones de *Cryptosporidium* spp., su distribución y su relación con factores ambientales en las provincias de Zaragoza y León, durante los años 2006-2013. Además, se estudia un brote acontecido en la provincia de Granada en el período de estudio.
- ❖ Establecer un criterio para determinar la relación epidemiológica de aislamientos de *Giardia duodenalis* a través del análisis de fragmentos de los genes *tpi* y *beta giardina*.

Objetivos específicos

- Identificar las especies, genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* spp. aislados de las muestras de heces procedentes de Zaragoza, León y Granada.
- Definir la estructura de población, analizando la distribución de los casos de cryptosporidiosis según factores como su origen, estacionalidad y edad de los pacientes.
- Caracterizar los aislamientos de *Cryptosporidium* causantes del brote de la guardería de Granada.
- Definir los criterios a utilizar para determinar la identidad de aislamientos de *Giardia*, aplicando modelos estadísticos al estudio de las SNPs que se obtienen en los amplificadores de fragmentos de los genes *tpi* y *beta giardina*.

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS

Cryptosporidium spp.

Se estudiaron mediante microscopía y técnicas de biología molecular un total de 194 muestras previamente diagnosticadas por microscopía y procedentes de pacientes de León, Zaragoza y Granada, España. Noventa y tres procedían de pacientes del Hospital de León, 92 del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza y 9 (2 de los cuales pertenecían al mismo paciente) del Departamento de Microbiología del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves” de Granada.

Todas las muestras fueron recogidas entre octubre de 2006 y diciembre de 2013, y conservadas a 4°C sin conservantes hasta su procesamiento.

Las muestras de Granada procedían de un brote de la guardería de la municipalidad de Macarena, Granada que ocurrió entre septiembre y diciembre de 2013.

Giardia spp.

Se estudiaron 63 muestras de *Giardia*, que correspondían a 26 pacientes, 19 de ellos procedían del Complejo Asistencial de León (6 de ellos eran niños de Sahara en acogida y uno era un niño adoptado de Etiopía) y 7 muestras fueron recogidas en el Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza. Todas ellas fueron previamente diagnosticadas como positivas para *Giardia* y tomadas en días alternos, por lo que entre la toma de una muestra y la siguiente, no sobrepasa los 3 días.

Las muestras de los pacientes de Zaragoza fueron recogidas en el año 2010 y las de León en los años 2010-2011.

MÉTODOS

Técnica de concentración

Cryptosporidium spp.

La identificación de ooquistes en muestras fecales se llevó a cabo mediante concentración con agua y acetato de etilo. De esta forma no se añade formaldehído para evitar inhibiciones de la PCR.

Una parte de cada muestra se resuspendió en agua y se agitó en vórtex para su homogeneización.

Seguidamente se filtró la muestra pasándola al tubo falcon cónico de 15 ml para centrifugación y se le añadió acetato de etilo (2 ml aprox.). Tras mezclar enérgicamente, se centrifugó a 500 x g, durante 10 minutos.

La centrifugación permitió separar dos fases: la superior que contiene elementos grasos y la inferior (contiene partículas ligeras en suspensión) separadas por una interfase que contiene elementos ligeros y desnaturalizados. En el fondo del tubo se depositó el sedimento con los ooquistes del parásito.

Este procedimiento permite eliminar las grasas de la muestra y que los ooquistes se depositen con los elementos no lipídicos en el sedimento.

El sobrenadante fue desechado y se colocó una gota del sedimento en un portaobjetos para su posterior tinción.

Giardia spp.

La concentración de los ooquistes de *Giardia duodenalis* se llevó a cabo mediante flotación en sacarosa.

Se diluyó la muestra con agua (~5-10 ml) y se mezcló con vórtex.

En un tubo Falcón, se colocó 10 ml de sacarosa 1M fría. Resbalando por la pared se vertió 5 ml de muestra diluida, de forma que quedó sobre la sacarosa sin mezclarse con ella. Seguidamente, se centrifugó a 1500 rpm durante 6 min.

Con pipeta Pasteur se recogió el menisco formado entre las dos fases resultantes y se pasó a un tubo limpio. Se añadió agua esterilizada hasta 40 ml. Se agitó bien y se centrifugó a 1500 rpm durante 6 min.

Se desechó sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 2,5 ml de H₂O destilada estéril.

Esta suspensión se depositó sobre 10 ml de sacarosa 0,5 M y se centrifugó a 1500 rpm durante 6 min.

El sedimento (~1 ml) fue recogido con pipeta y se pasó al otro tubo limpio, donde se lavó, añadiendo 40 ml de agua destilada estéril, agitando y centrifugando a 5300 rpm durante 5 min.

Se desechó el sobrenadante y al sedimento se le añadió 1 ml de agua destilada. Se mezcló la muestra y se pasó a un tubo eppendorf de 1,5 ml.

Se cogió una gota para observarla al microscopio y el resto de la muestra se guardó a -20°C hasta su utilización.

Tinción Ziehl-Neelsen modificada para *Cryptosporidium* spp.

La técnica utilizada para la tinción de *Cryptosporidium* corresponde a la modificación de la técnica de Ziehl-Neelsen publicada por Henriksen y Pohlenz en 1981 y que consiste en lo siguiente:

Una gota de muestra procedente de la concentración con agua y acetato de etilo se colocó en un portaobjeto realizando un frotis y se dejó secar. Seguidamente, la preparación se cubrió con metanol para su fijación.

Cuando la muestra se secó completamente se cubrió con un papel de filtro empapado en fucsina fenicada, dejando actuar la fucsina durante 20 minutos. El papel se retiró cuidadosamente y se lavó el portaobjetos con agua, con cuidado para no desprender la muestra.

Después del lavado se cubrió la muestra con ácido sulfúrico, para decolorarla, dejando actuar 1 minuto. Seguidamente, se lavó con agua y se añadió azul de metileno, dejándolo actuar durante un minuto. Tras un último lavado, se dejó secar el portaobjeto al aire en posición vertical.

Con este procedimiento, los ooquistes aparecen de color rosa-rojo con gránulos excéntricos oscuros y fondo azul.

Microscopía

Cryptosporidium spp.

Las muestras teñidas con técnica Ziehl Neelsen modificada fueron revisadas con un microscopio óptico ZEISS west Germany a 40x y a 100x (Figura 1).

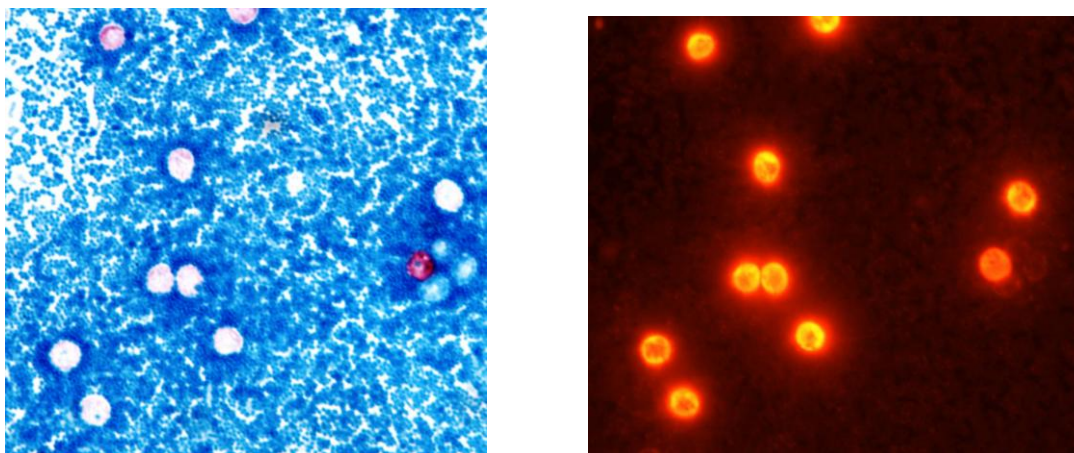


Figura. 1. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp con la tinción Ziehl-Neelsen modificada vistas con el microscopio Nikon Eclipse 80i: a la izquierda - en microscopio óptico a 100x y a la derecha - el mismo campo con microscopia epifluorescente (con filtro G-2A, Excitación: 510-566, Emisión: 590).

***Giardia* spp.**

La observación de *Giardia duodenalis* se realizó en fresco, tomando una gota de la concentración realizada por flotación en sacarosa, que fue colocada en un portaobjetos y cubierta con cubreobjetos. Se observó la preparación al microscopio óptico ZEISS west Germany a 40x para comprobar la presencia de ooquistes de *Giardia* spp. (Figura 2)



Figura 2: Ooquistes de *Giardia duodenalis* vistas en microscopio óptico a 40x.

Extracción de ADN genómico de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp.

Aquellas muestras en que se observaron formas compatibles con ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia duodenalis* por microscopia (Figura. 1 y Figura 2) se utilizaron para extracción de ADN, usando la muestra procedente de concentración. En las que la observación microscópica fue negativa, se procedió a la extracción de ADN directamente de heces.

En el caso de las muestras de *Giardia*, se tomaron 100 µl de muestra y se añadieron 100 µl de solución de lisis (4M NaCl, 10% SDS, 0,5M EDTA en tampón 1 M Tris (pH 8.0)) y 10 ml de proteinasa K a 20 mg/ml. Esta mezcla, se incubó a 56°C durante 24 horas y posteriormente se sometió a 4 ciclos de congelación (30 min, -20°C) y descongelación (10 min, 100°C) para romper los quistes con mayor eficacia.

Para la extracción de ADN se utilizó el kit de extracción de ADN IBIAN® DNA Stool Kit o el NORGEN BIOTEC CORP DNA Isolation Kit. El protocolo de la extracción de ambos Kit se basa en lo siguiente:

Para la extracción se utilizan unos 200-400 mg de la muestra (fresca o procedente de la concentración o de la ruptura de quistes de *Giardia*). A la muestra se añade 1,2 ml o 1,1 ml de la solución de Lisis (Lysis Buffer) (dependiendo del Kit) y se mezcla con vórtex para que se rompan los ooquistes dejando el ADN libre.

La adición de 200 µl de solución bloqueante de pH 5 (Binding Buffer) neutraliza el pH muy básico en que se estaba trabajando en las fases previas. Seguidamente, la mezcla se deposita en una columna que dispone de una membrana en la que el DNA queda fijado.

El posterior lavado con las soluciones Wash Buffer I y Wash Buffer II elimina los restos celulares y deja el ADN limpio en la membrana de la columna.

En el paso final se utilizan 100 µl de buffer de elución (Elution Buffer) para eluir el ADN, que puede ser almacenado hasta su utilización a 2-8°C durante unos pocos días y -20°C durante un largo tiempo.

Técnicas moleculares para la detección de *Cryptosporidium* spp.

PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) de un fragmento del gen SSU rRNA

La técnica de PCR-RFLP fue aplicada a todas las muestras en que se estudió *Cryptosporidium* con el fin de diferenciar las especies y genotipos que contenían.

PCR – la reacción en cadena de la polimerasa

Para todas las muestras se procedió a realizar la técnica de PCR anidada que amplifica el gen de subunidad 18S del rRNA (SSU rRNA) (Xiao et al. 1999). En la primera PCR se obtuvo un producto de 1325 pares de bases y la segunda de 826-864 pb.

En la primera PCR para la amplificación del fragmento del gen se utilizaron los cebadores:

Ssu1 (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3')

Ssu2 (5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3')

y en la segunda PCR los cebadores:

Ssu3 (5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3')

Ssu4 (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3').

Para la primera PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción, en un volumen final de 25 µl:

Tampón de reacción (1X)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
SSU 1 (10 µM)	0,25 µl
SSU 2 (10 µM)	0,25 µl

dNTPs (25 mM)	0,2 µl
Taq DNA Polimerasa (1U/µl)	2,5 µl
ADN	2 µl
H ₂ O	16,3 µl

Para la segunda PCR se utilizó la mezcla de reacción, en un volumen final de 50 µl. La mezcla fue el siguiente:

Tampón de reacción (10X)	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
SSU 3 (10 µM)	0,5 µl
SSU 4 (10 µM)	0,5 µl
dNTPs (25 mM)	0,4 µl
Producto de la 1ª PCR	3 µl
H ₂ O	36,6 µl
Taq DNA Polimerasa (1U/µl)	2,5 µl

Ambas reacciones se llevaron a cabo, por separado, en tubos de 200 µl, en los termocicladores MiniCyclerTM MJ Research y Applied Biosystems 2720 Thermal cycler, con el siguiente programa:

- 1) Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos.
- 2) Amplificación mediante 35 ciclos de:
 - 45 segundos a 94°C,
 - 45 segundos a 55°C,
 - 1 min a 72°C.
- 3) Extensión final a 72°C durante 7 minutos.

RFLP – análisis de polimorfismo de los fragmentos de restricción

Las muestras positivas de la 2ª PCR fueron sometidas a una digestión con las endonucleasas *SspI* y *VspI* con el fin de obtener una serie de fragmentos que dan lugar a un patrón de bandas PCR-RFLP para diferenciar las especies de *Cryptosporidium* (Tabla 1).

La mezcla de reacción de un volumen total de 20 µl fue la siguiente:

Tampón	2 µl
Enzima	1 µl
ADN (producto de la 2ª PCR)	3 µl
H ₂ O	14 µl

En la tabla 1 se muestran los patrones de bandas que aparecen en algunas especies de *Cryptosporidium* y que sirven para su diferenciación.

Tabla 1. Patrones de bandas PCR-RFLP de algunas especies de *Cryptosporidium* digeridos con las enzimas *SspI* y *VspI* (Feng et al., 2007; Xiao et al., 1999)

Especies/genotipos de <i>Cryptosporidium</i>	Digestión con la endonucleasa <i>SspI</i> (pb)	Digestión con la endonucleasa <i>VspI</i> (pb)
<i>C. parvum</i>	449, 267, 108, 12*,11*	628, 115, 104
<i>C. hominis</i>	450, 267, 111, 12*,11*	561, 115, 104*, 71
<i>C. cervino</i>	454, 384, 11*	461, 169, 115, 104*
<i>C. felis</i>	426, 390, 34*, 14*	476, 182, 104*

*Bandas no visibles en el gel de agarosa

PCR de un fragmento del gen *gp60*

La amplificación de un fragmento del gen *gp60* se realizó para determinar las familias y los subtipos de aislados de *C. parvum* y *C. hominis*. El gen *gp60* codifica la glucoproteína de 60 KDa presente en la superficie de los esporozoítos de *Cryptosporidium* y utilizada en la adhesión del mismo a la célula hospedadora (Strong et al., 2000).

El fragmento del gen *gp60* (800-850 pb) fue amplificado por PCR anidada (Glaberman et al., 2002).

En la primera PCR se utilizaron los cebadores:

AL3531 (5'- ATAGTCTCCGCTGTATTC -3')

AL3535 (5'-GGAAGGAACGATGTATCT -3'),

y en la segunda PCR, los cebadores:

AL3532 (5'-TCCGCTGTATTCTCAGCC -3')

AL3534 (5'- GCAGAGGAACCAGCATC-3')

Para ambas reacciones PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción, en un volumen final de 50 µl:

Tampón de reacción (10X)	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3 µl
AL3531/AL3532 (10 µM)	1 µl
AL3535/AL3534 (10 µM)	1 µl
dNTPs (25 mM)	0,5 µl
ADN/Producto de la 1ª PCR	3 µl
H ₂ O	36,2 µl
Taq DNA Polymerasa (5U/µl)	0,3 µl

Las dos reacciones se llevaron a cabo en tubos de 200 µl para PCR en los termocicladores MiniCyclerTM MJ Research y Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, con el siguiente programa:

- 1) Desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos.
- 2) Amplificación mediante 40 ciclos de:

45 segundos a 95°C,

45 segundos a 52°C,

1 min a 72°C.
- 3) Extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Para las muestras que dieron negativo se amplificó el fragmento más pequeño (≈ 400 pb) usando los siguientes primers (Sulaiman et al., 2005):

PCR 1^a

AL3531 (5'-ATAGTCTCCGCTGTATTC-3')

AL3533 (5'-GAGATATATCTTGGTGCG-3')

PCR 2^a

AL3532 (5'-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3')

LX0029 (5'-CGAACCACATTACAAATGAAGT-3')

Y con el siguiente programa:

- 1) Desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos.
- 2) Amplificación mediante 35 ciclos de:

45 segundos a 95°C,

45 segundos a 50°C,

1 min a 72°C.
- 3) Extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Para ambas reacciones PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción, en un volumen final de 25 µl:

Tampón de reacción (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
AL3531/AL3532 (10 µM)	0,5 µl
AL3535/AL3534 (10 µM)	0,5 µl
dNTPs (25 mM)	0,2 µl
ADN para PCR 1 ^a	5 µl
ADN (Producto de la 1 ^a PCR) para PCR 2 ^a	1 µl
H ₂ O para PCR 1 ^a	14,6 µl
H ₂ O para PCR 2 ^a	18,6 µl
Taq DNA Polimerasa (5U/µl)	0,2 µl

En las muestras en las que se amplificó el fragmento de 800-850 pb los productos de la segunda PCR se visualizaron mediante electroforesis (descrita a continuación) para confirmar la presencia de amplicón. Los productos resultantes se purificaron utilizando el kit GFXTM PCR DNA and Gel band Purification kit (GE, Healthcare) y se llevaron a secuenciar al laboratorio.

Para las muestras que dieron positivo amplificando el fragmento de ~400 pb se visualizaron los productos de la primera y de la segunda PCR. La mayoría dio positivo con la primera PCR y esta se envió a secuenciar con sus respectivos primers, otras pocas que dieron positivo con la segunda PCR se procedió igual enviando productos con primers de la PCR 2^a.

Técnicas moleculares para la detección de *Giardia duodenalis*.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) del gen *tpi*

La técnica de PCR del gen *tpi* fue aplicada a todas las muestras en las que se deseaba identificar los genotipos (assemblages) de *Giardia* presentes. Para ello, se procedió a realizar la técnica de PCR anidada que amplifica un fragmento del gen de triosafosfatisomerasa (*tpi*) (Sulaiman et al., 2003).

En la primera PCR se obtuvo un fragmento del gen *tpi* de 605 pb y en la segunda PCR se obtuvo un fragmento de 530 pb

En la primera PCR para la amplificación del fragmento del gen se utilizaron los cebadores (Sulaiman et al., 2003):

AL3543 (5'-AAATATGCCTGCTCGTCG-3')

AL3546 (5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3')

Y en la segunda PCR, los cebadores (Amar et al., 2002):

AL3544 (5'-CCCTTCATCGGTGGTAACTT-3')

AL3545 (5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3')

Para la primera reacción de PCR se utilizó la siguiente mezcla, en un volumen final de 50 µl:

Tampon de reacción (10X)	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3 µl
dNTPs (25 mM)	0,4 µl
AL3543 (10 µM)	2 µl
AL3546 (10 µM)	2 µl
H ₂ O	32,6 µl

ADN	5 µl
Taq DNA Polimerasa (5U/µl)	0,3 µl

Para la segunda reacción de PCR se utilizó la siguiente mezcla, en un volumen final de 50 µl:

Tampón de reacción (10X)	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3 µl
dNTPs (25 mM)	0,4 µl
AL3544 (10 µM)	2 µl
AL3545 (10 µM)	2 µl
H ₂ O	35,1 µl
ADN/Producto de la 1ª PCR	2,5 µl
Taq DNA Polimerasa (5U/µl)	0,3 µl

Las dos reacciones se llevaron a cabo en tubos de 200 µl para PCR en los termocicladores MiniCycler[™] MJ Research y Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, con el siguiente programa:

- 1) Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos.
- 2) Amplificación mediante 35 ciclos de:
 - 45 segundos a 94°C,
 - 45 segundos a 50°C,
 - 1 min a 72°C.
- 3) Extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de la segunda PCR se visualizaron mediante electroforesis (descrita a continuación) para confirmar la presencia de un amplicón.

PCR del gen de la β -giardina

La técnica de PCR-RFLP del gen de β -giardina ha sido aplicada a todas las muestras mediante un protocolo de PCR anidada. En la primera PCR se obtuvo un fragmento de 753 pb y en la segunda PCR una amplificación final de 511 pb.

Para la primera reacción de PCR se utilizaron los cebadores diseñados y descritos por Caccio et al., 2002:

G7 (5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC -3')

G759 (5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC -3')

Y para la segunda, los cebadores diseñados por Lalle et al., 2005:

G1 (5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG -3')

G2 (5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT -3')

Para la primera reacción de PCR se utilizó la siguiente mezcla, en un volumen final de 50 μ l:

Tampon de reacción (10X)	5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μ l
dNTPs (25 mM)	0,4 μ l
G7 (10 μ M)	2 μ l
G759 (10 μ M)	2 μ l
H ₂ O	36,1 μ l
ADN	3 μ l
Taq DNA Polymerasa (5U/ μ l)	0,3 μ l

Para la segunda reacción de PCR se utilizó la siguiente mezcla, en un volumen final de 50 μ l:

Tampón de reacción (10X)	5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	3 μ l
dNTPs (25 mM)	0,4 μ l
G1 (10 μ M)	2 μ l
G2 (10 μ M)	2 μ l
H ₂ O	35,6 μ l
ADN/Producto de la 1ª PCR	2 μ l
Taq DNA Polymerasa (5U/ μ l)	0,3 μ l

Ambas reacciones se llevaron a cabo en tubos de 200 μ l en los termocicladores MiniCyclerTM MJ Research y Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, con el siguiente programa:

- 1) Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos.
- 2) Amplificación mediante 35 ciclos de:
 - 30 segundos a 95°C,
 - 30 segundos a 65°C,
 - 1 min a 72°C.
- 3) Extensión final a 72°C durante 7 minutos.

Los productos de la segunda PCR se visualizaron mediante electroforesis (descrita a continuación) para confirmar la presencia de amplicón.

Electroforesis en el gel de agarosa

La valoración de los resultados de PCR y digestión se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa del 1,5%. (Figura 3, 4)

El gel fue preparado con agarosa (Agarosa tipo I estándar PB, Panreac), TBE X 0.5 (Tris 0.045 M, ácido bórico 0.045 M, EDTA 0.001M, pH 8) y bromuro de etidio 0.5 µg/ml.

La electroforesis se desarrolló a 97-100 V. El marcador utilizado fue DNA del Fago λ (Promega 502 µg/ml) digerido con *Pst*I (Advanced Biotechnologies 10U/µl).

El marcador y las muestras fueron cargados con tampón de carga a razón de 3µl de tampón por 5µl de muestra o del marcador.

La visualización de los fragmentos de ADN se consiguió con un transiluminador Viber Lourmet y la captura de las fotos con un capturador de imágenes de la misma casa comercial. (Figura 3, 4)

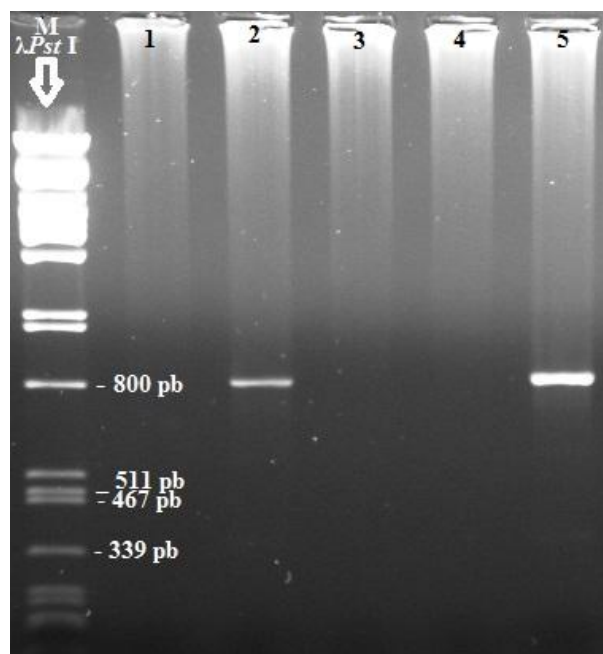


Figura 3: Visualización en el gel de agarosa de la PCR del gen *SSU* rRNA (M-marcaador; 1, 3, 4 – muestras negativas; 2, 5- muestras positivas al gen

SSU rRNA).

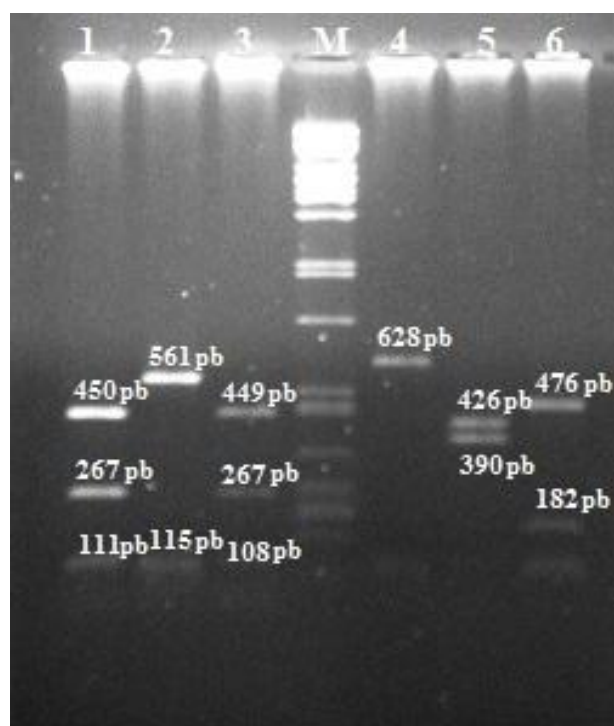


Figura 4: Visualización en el gel de agarosa de la digestión
(1,2 – *C. hominis*; 3,4 – *C. parvum*; 5, 6 – *C. felis*) con enzimas de restricción
(1, 3, 5 – *SspI*; 2, 4, 6 - *VspI*)

Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas

Los productos de la primera o segunda PCR del gen de subunidad 18S, del *gp60*, del *tpi* y de la *beta giardina* fueron purificados con el kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purificación Kit y llevados al CITOGEN, SL, Zaragoza, España.

Las secuencias obtenidas se analizaron con los programas Bio Edit v7.0.9 y ChromasLite v2.3.0.0 y se compararon con las secuencias registradas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete SPSS v. 15.0, y la prueba χ^2 para una significación estadística del 5%, por lo que se considera que una asociación es estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

Para el análisis y comparación de las sustituciones nucleotídicas puntuales (SNPs) obtenidas y dado que el número SNPs diferentes encontrados entre las dos tipificaciones para cada paciente con *Giardia duodenalis* sigue una distribución de Poisson de parámetro λ desconocido, los intervalos de confianza se realizaron siguiendo el método exacto, en caso de que los grados de libertad fueran iguales o menores de 30 y mediante método aproximado a través de la normal, en caso de que los grados de libertad fueran más de 30.

RESULTADOS

CRYPTOSPORIDIUM SPP.

El análisis mediante técnicas de tinción Ziehl-Neelsen modificada y/o PCR, de un total de 194 muestras, 93 procedentes de pacientes del Complejo Asistencial de León, 92 del Hospital Clínico “Lozano Blesa” de Zaragoza y 9 de las guarderías de municipalidad de Macarena de Granada, dio resultado positivo para *Cryptosporidium* spp. en 153 muestras. Todos los pacientes se encontraban en el rango de edad comprendido entre 0 y 9 años, excepto 4 de ellos, que tenían edades superiores a los 18 años. En la figura 1 se puede observar además, que el 93% de los pacientes tenían entre 0 – 5 años. El 50% de los pacientes (77/153) fueron varones, el 41% (62/153) eran mujeres y para el 9% (14/153) restante no se dispuso de los datos correspondientes (Figura 2).

En la figura 3 se puede observar la distribución de los casos de *Cryptosporidium* spp. en los años en que se realizó el estudio.

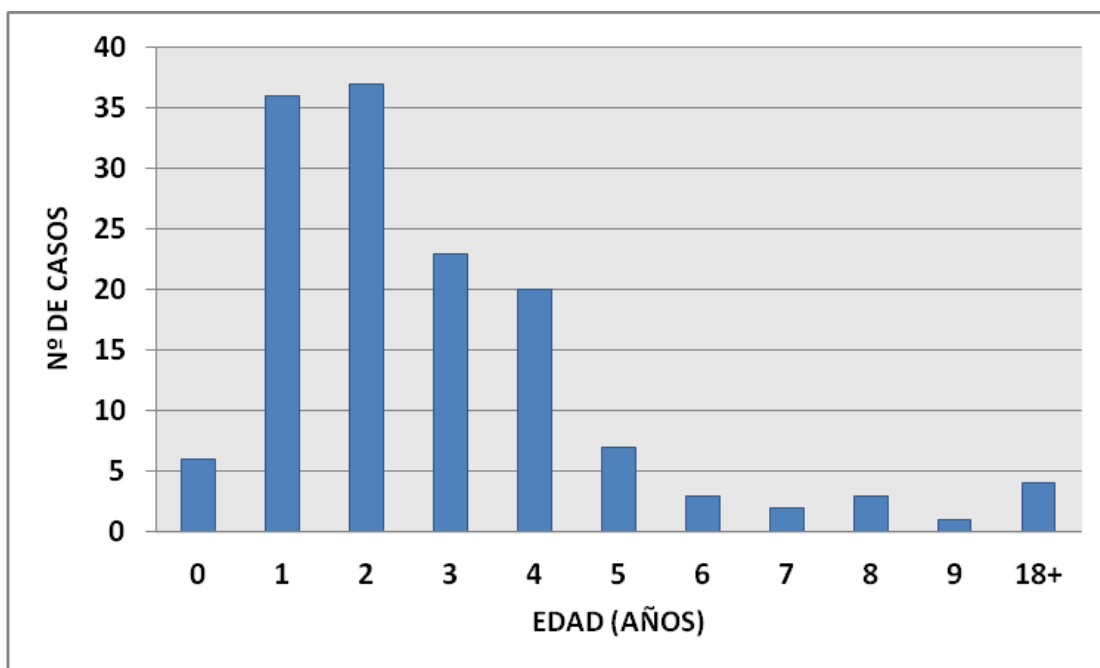


Figura 1. Número de casos por edad.

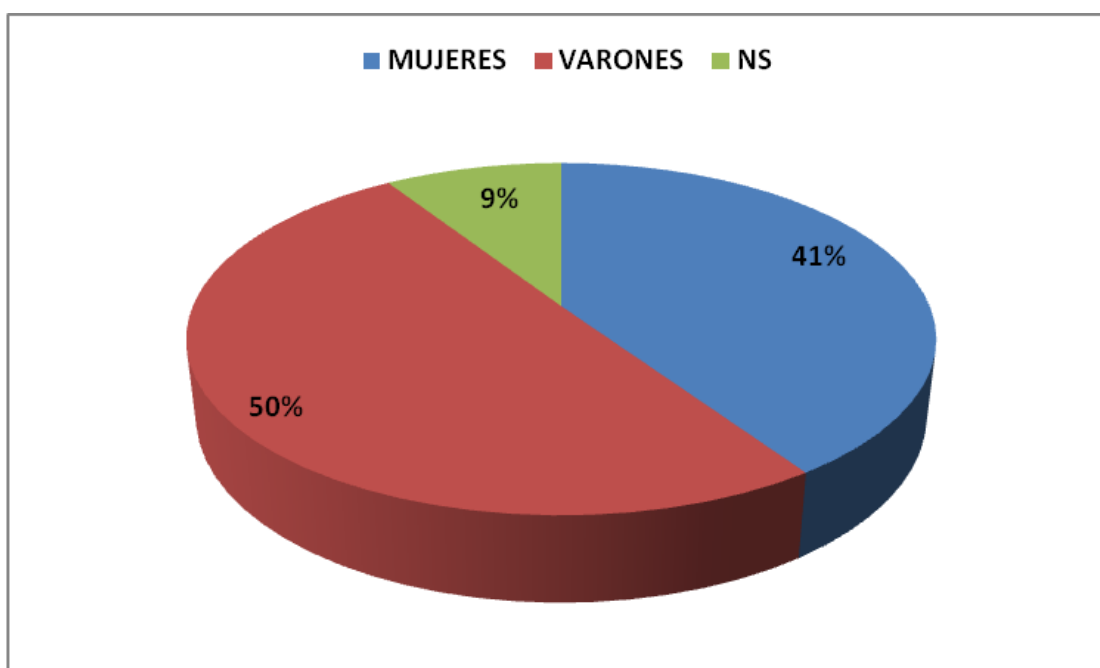


Figura 2. Distribución de la cryptosporidiosis por género.

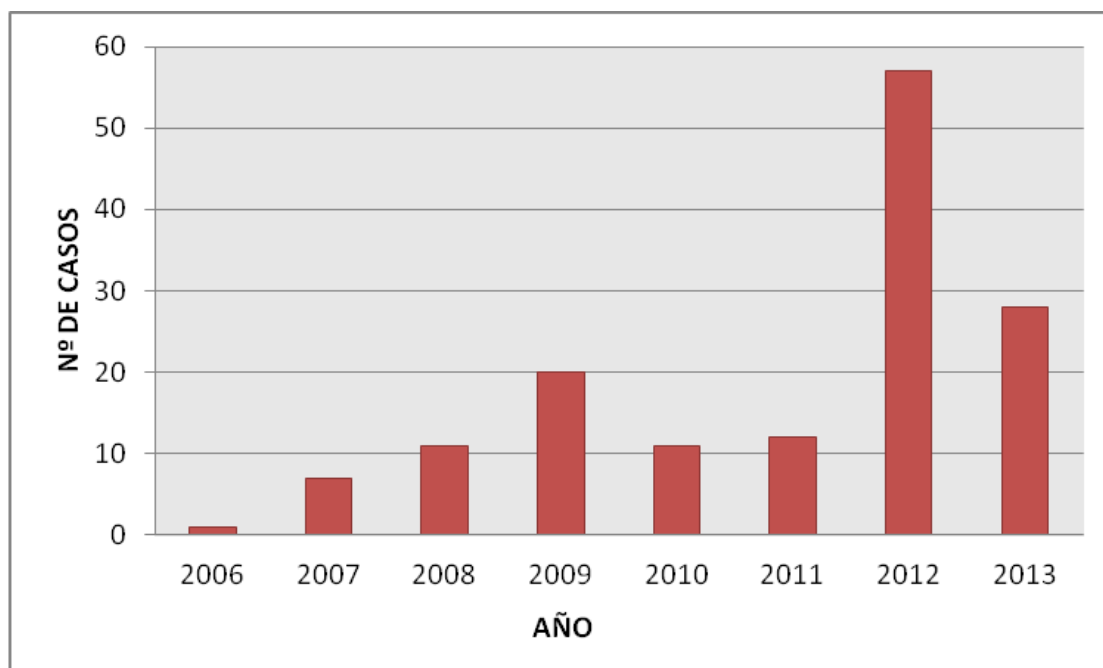


Figura 3. Distribución de la cryptosporidiosis por año.

En lo que respecta a las muestras procedentes del brote de la guardería de Granada, el análisis preliminar se llevó a cabo en Granada por los Servicios de Salud Pública y por el Servicio del Complejo Hospitalario Universitario de Granada. El brote ocurrió entre septiembre y diciembre del año 2013. En este periodo de tiempo a la guardería asistían 70 niños, con edades comprendidas entre 0 y 3 años, además de 5 cuidadores. Como diagnóstico previo se examinaron 82 muestras de heces de las 75 personas incluyendo 60 niños menores de 6 años, que tenían contacto directo con la guardería, 9 miembros de familias entre 6 y 16 años y 6 trabajadores de la guardería mayores de 16 años. A siete personas se les recogieron 2 muestras. Para todas las muestras se ha realizado el coprocultivo y la detección de antígeno para rotavirus y adenovirus. Adicionalmente se investigó la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia duodenalis* por inmunocromatografía y microscopía y la presencia de otros parásitos intestinales por microscopía. En el resultado del diagnóstico previo, todas las muestras dieron negativo en coprocultivo y presencia de virus. En el estudio parasitológico, 7 (13,3%) de las muestras de niños dieron positivos para *Cryptosporidium* por microscopía e inmunocromatografía, 3 (5%) para *Giardia duodenalis* y uno para *Blastocystis hominis*. Las muestras de adultos fueron todas negativas para parásitos. Ninguno de los niños parasitados había viajado previamente al

extranjero (Goñi et al., 2014). Todas las muestras que dieron positivo por microscopía e inmunocromatografía en este estudio previo, han sido analizadas por las técnicas de biología molecular.

Observación microscópica

De las 194 muestras analizadas, solo en 88 (45%) se observaron los ooquistes de *Cryptosporidium* en microscopio óptico a 40x y a 100x usando la tinción Ziehl-Neelsen modificada (Figura 4). En 4 muestras, además de *Cryptosporidium* spp., se detectó también *Giardia* spp. Una de las muestras, procedente de un paciente de León, contenía también *Campylobacter*, según diagnóstico emitido en origen.

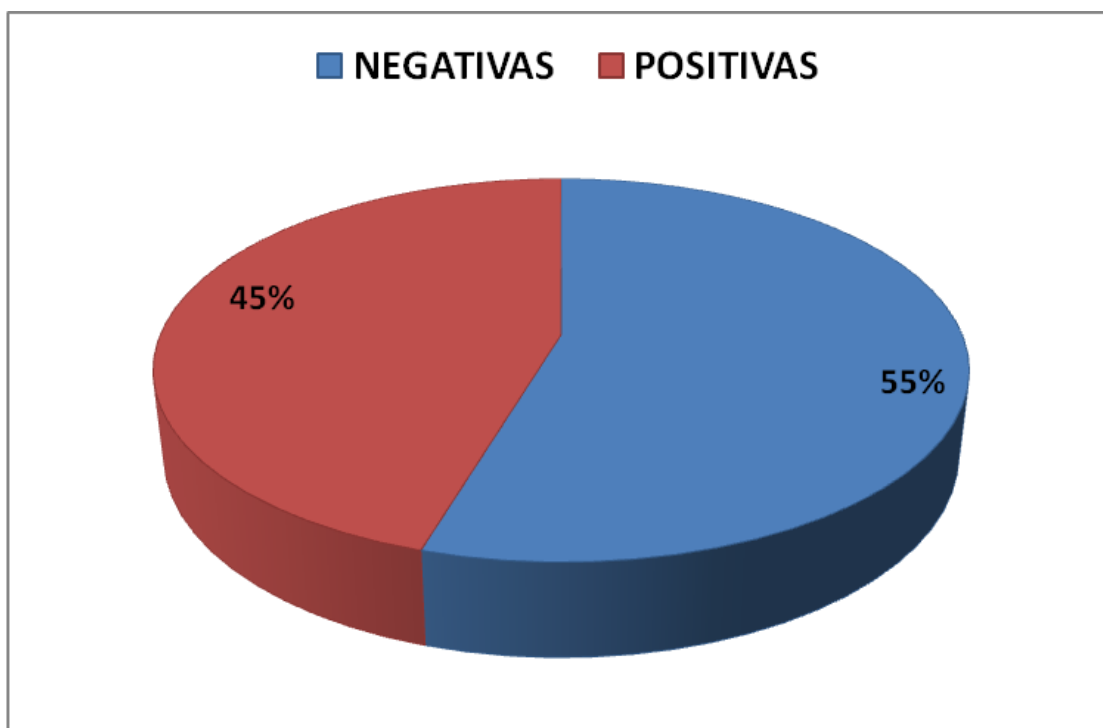


Figura 4. Resultado del análisis microscópico de las muestras.

Tipificación molecular

Todas las muestras de heces, independientemente del resultado de la tinción, se sometieron a PCR para la amplificación de un fragmento de ~800 pb del gen de la subunidad 18S ribosomal (*SSU rRNA*), con los cebadores específicos Ssu3 y Ssu4. De las 194 muestras estudiadas, en 141 (73%) se observó la amplificación de un fragmento del tamaño esperado (Figura 5).

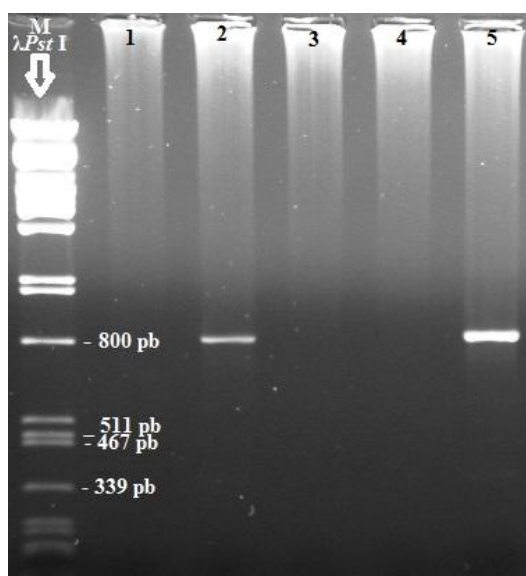


Figura 5. PCR del gen SSU rRNA
(1- marcador λ PstI; 2,5-muestras positivas con el gen SSU).

Aplicando RFLP (Figuras 6 y 7) se consiguió determinar la especie de las 141 muestras que dieron positivas por PCR. Los resultados se muestran en la Tabla 1. En las figuras 6 y 7 se muestran los perfiles de bandas que se obtienen por PCR-RFLP.

Tabla 1: Especies de *Cryptosporidium* identificadas con la técnica PCR (SSU) - RFLP.

	LEÓN	ZARAGOZA	GRANADA	TOTAL
<i>C. hominis</i>	44 (60,3%)	53 (88,3%)	8 (100%)	105 (74%)
<i>C. parvum</i>	28 (38,3%)	5 (8,3%)	-	33 (23%)
<i>C. ubiquitum</i>	1 (1,4%)	1 (1,7%)	-	2 (2%)
<i>C. felis</i>	-	1 (1,7%)	-	1 (1%)
TOTAL	73 (100%)	60 (100%)	8 (100%)	141 (100%)

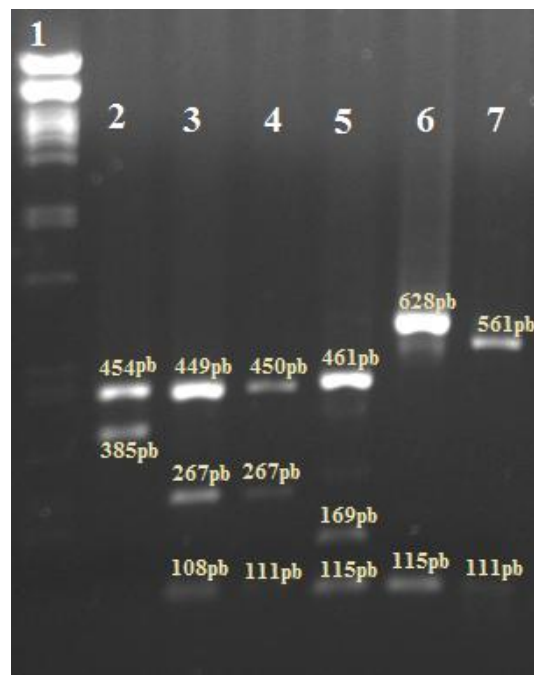


Figura 6. Fotografía de patrones RFLP obtenidos:

**1-marcador λ PstI; 2-*C. ubiquitum* (SspI); 3-*C. parvum* (SspI); 4-*C. hominis* (SspI);
5-*C.ubiquitum* (VspI); 6-*C. parvum* (VspI); 7-*C. hominis* (VspI).**

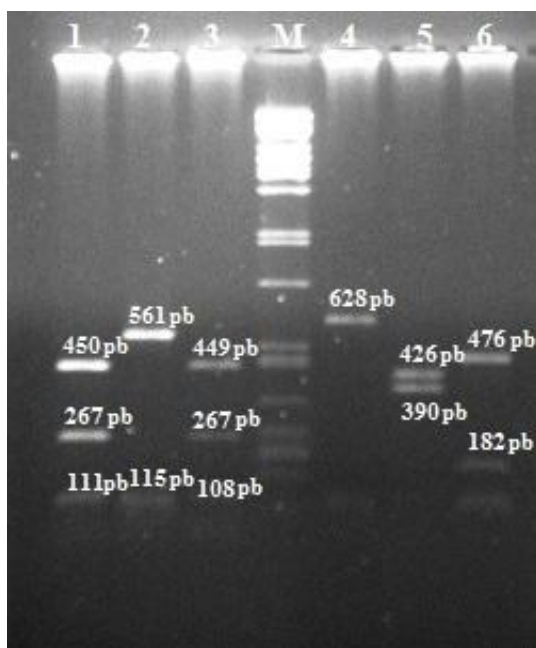


Figura 7. Fotografía de patrones RFLP obtenidos:

**1-*C. hominis* (*SspI*); 2- *C. hominis* (*VspI*); 3-*C. parvum* (*SspI*); 4- *C. parvum* (*VspI*);
2-5- *C. felis* (*SspI*); 6- *C. felis* (*VspI*).**

Todas las muestras que dieron positivo con la tinción y/o con PCR-SSU, fueron sometidas a la amplificación de un fragmento del gen *gp60* por PCR. De las 153 muestras, 104 (68%) dieron positivas.

Las muestras que resultaron positivas en la amplificación del gen *gp60* mediante PCR (Figura 8) y/o las muestras positivas con el gen *SSU* (en total 153) se enviaron a secuenciar. Las secuencias recibidas fueron analizadas y comparadas con las depositadas en el GenBank utilizando la herramienta BLAST.

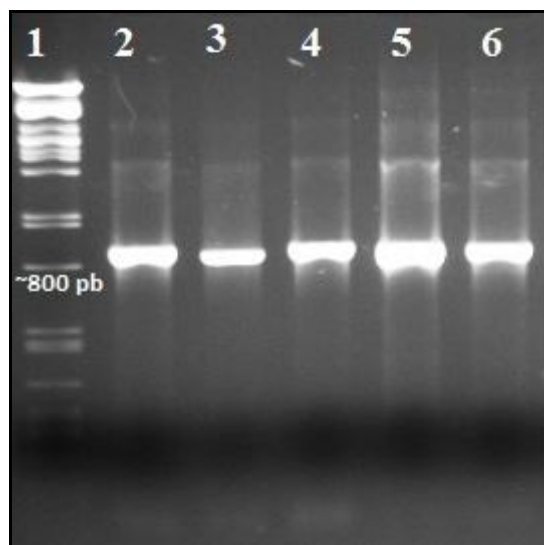


Figura 8. PCR del gen *gp60*:

1-marcador λ *Pst*I; 2, 3, 4, 5, 6 - muestras positivas con el gen *gp60*.

Con las secuencias obtenidas para el gen *SSU*, el gen *gp60* y el análisis RFLP, se pudieron genotipar un total de 153 muestras. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Especies de *Cryptosporidium* identificadas en Zaragoza, León y Granada con la técnica PCR (*SSU*) -RFLP y PCR (*gp60*).

	LEÓN	ZARAGOZA	GRANADA	TOTAL
<i>C. hominis</i>	50 (62,5%)	56 (87,5%)	9 (100%)	115 (75%)
<i>C. parvum</i>	29 (36,25%)	6 (9,4%)	-	35 (23%)
<i>C. ubiquitum</i>	1 (1,25%)	1 (1,55%)	-	2 (1%)
<i>C. felis</i>	-	1 (1,55%)	-	1 (1%)
TOTAL	80 (100%)	64 (100%)	9 (100%)	153 (100%)

Estructura de población general

Distribución de los casos según su origen

De todas las muestras positivas, el 28,1% (43/153) de los pacientes habitaban en el medio rural, 64,7% (99/153) en el medio urbano y del 7,2% (11/153) restante se desconocía el origen (Figura 9)

En el medio rural, el 76,7% (33/43) de las muestras contenía *C. hominis*, el 18,6% (8/43) *C. parvum* y el 4,7% (2/43) *C. ubiquitum*. En el medio urbano, el 73,7% (73/99) de los aislamientos correspondió a *C. hominis*, el 25,3% (25/99) a *C. parvum* y 1% (1/99) a *C. felis*. (Figura 10).

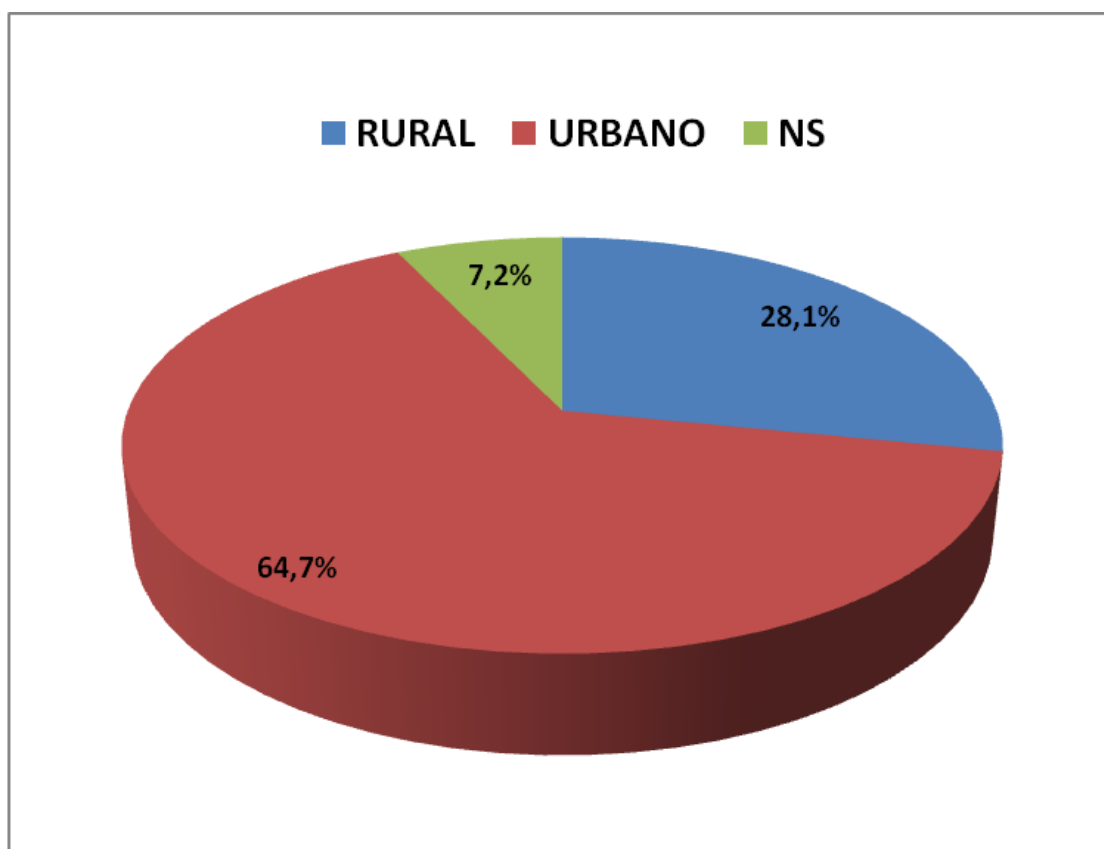


Figura 9. Distribución de de *Cryptosporidium* por ámbitos.

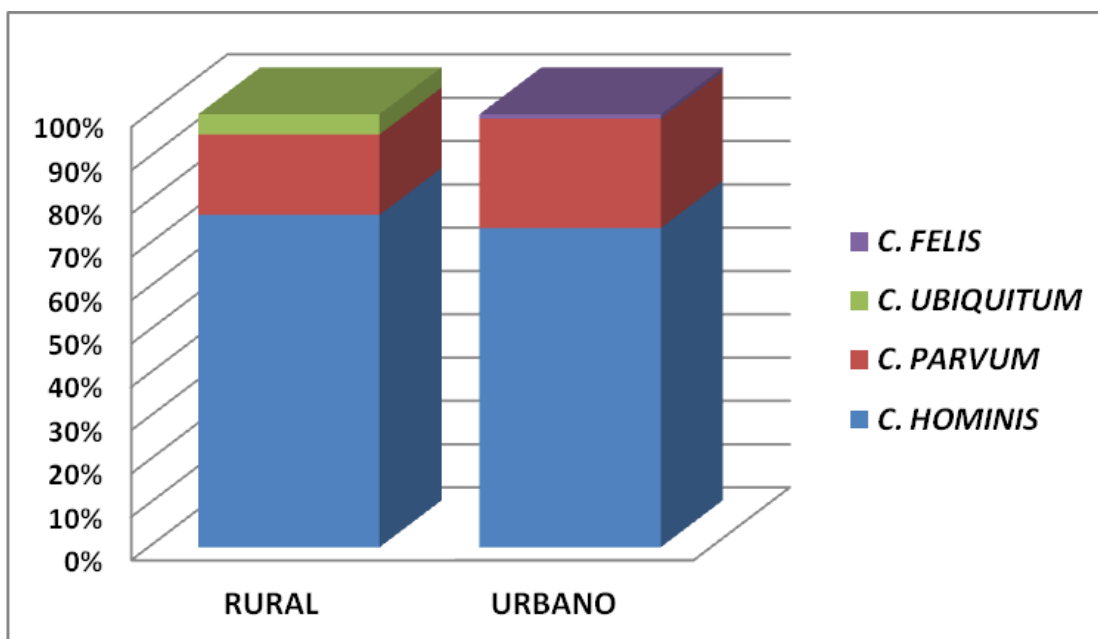


Figura 10. Distribución de especies de *Cryptosporidium* por ámbitos.

Estacionalidad

Se estudió la relación entre las especies de *Cryptosporidium* y la estacionalidad, agrupando los aislamientos según el mes de su aislamiento, por cuatrimestres y por trimestres. En ningún caso se encontró asociación estadísticamente significativa. Sin embargo, cuando se tomó el total de la muestra, se observó tendencia al aumento de casos de *Cryptosporidium* spp. en el tercer cuatrimestre (Figura 11).

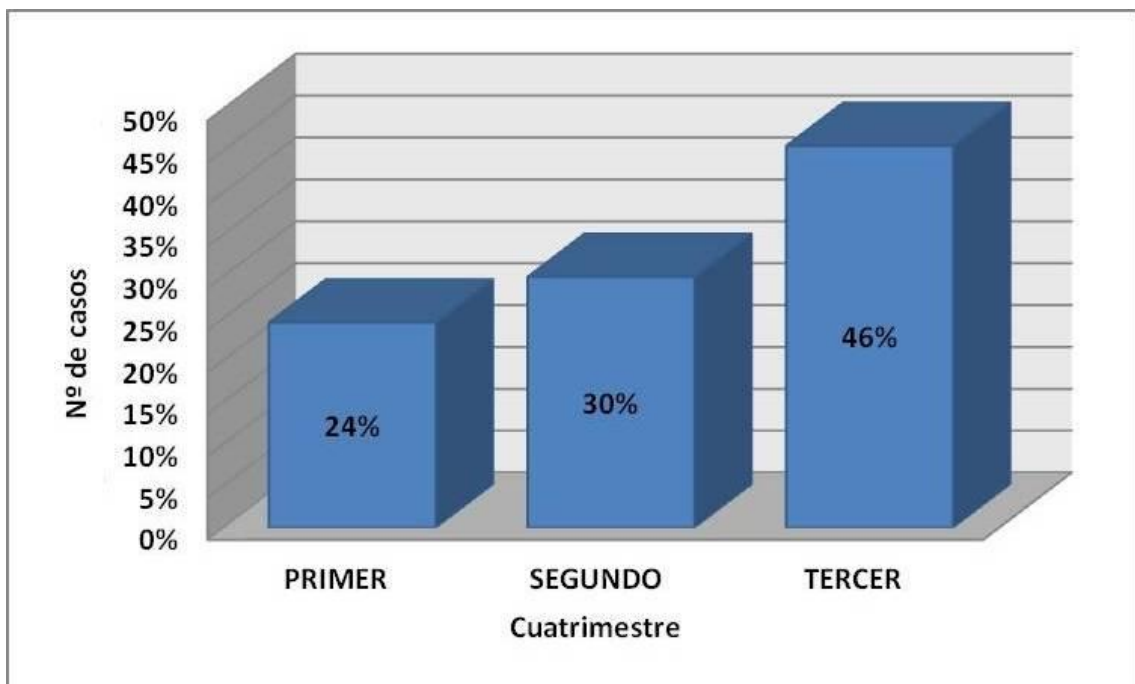


Figura 11. Distribución de los casos de cryptosporidiosis estudiados por cuatrimestres.

Distribución de las especies por intervalos de la edad de los pacientes

La agrupación de los casos por especie de *Cryptosporidium* e intervalo de edad de los pacientes: [0-4], [5-10] y [18+], permitió observar que el 85,9% (122/142) de los casos se da entre niños de 0 a 4 años, seguido por un 11,3% (16/142) entre los niños de 5 a 10 años y solo el 2,8% (4/142) se da en adultos (Figura 12). Además, se observan diferencias estadísticamente significativas entre la infección por *C. hominis* y *C. parvum* en niños de 0 a 4 años, siendo más probables en este rango de edad, las infecciones debidas a *C. hominis* que las debidas a *C. parvum*.

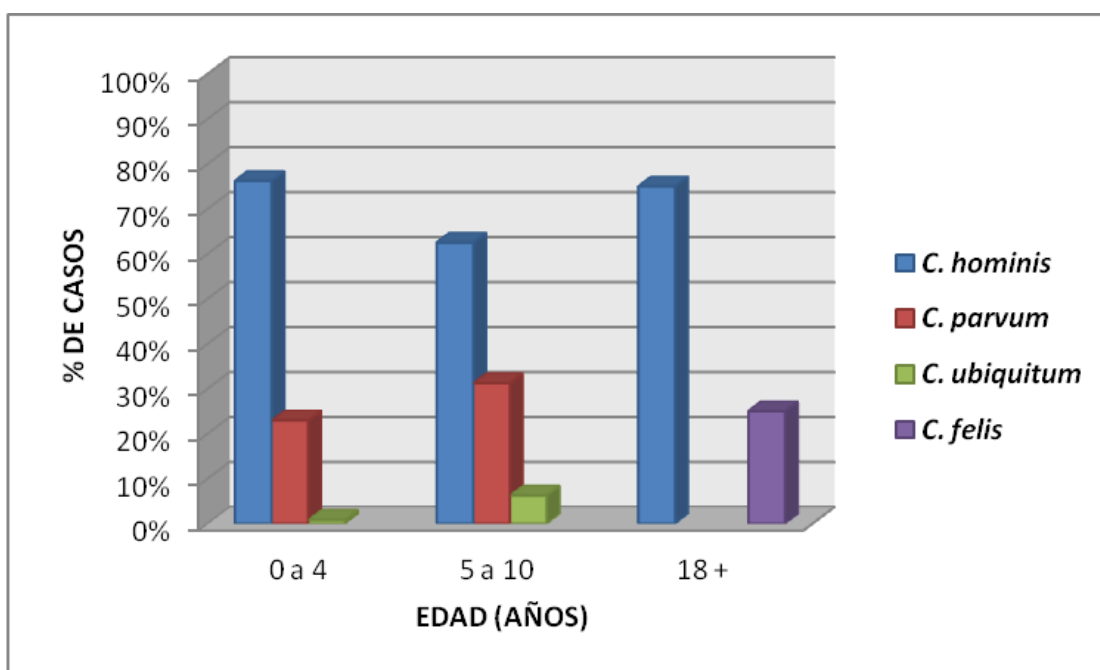


Figura 12. Distribución de los casos de cryptosporidiosis según la edad de los pacientes de la muestra.

Sí que se encontró asociación estadísticamente significativa ($p < 0.028$) entre las especies de *Cryptosporidium* y la edad de los pacientes cuando se les agrupa según la edad escolar (guardería [0-2], infantil [3-5] y primaria [6-11]) (Figura 13). *C. hominis*, de transmisión más frecuente de persona a persona, predomina en los niños de 0-2 años de edad, mientras que *C. parvum*, aparece en porcentaje más alto tanto en niños de 3-5 años como en los de 6-11 años.

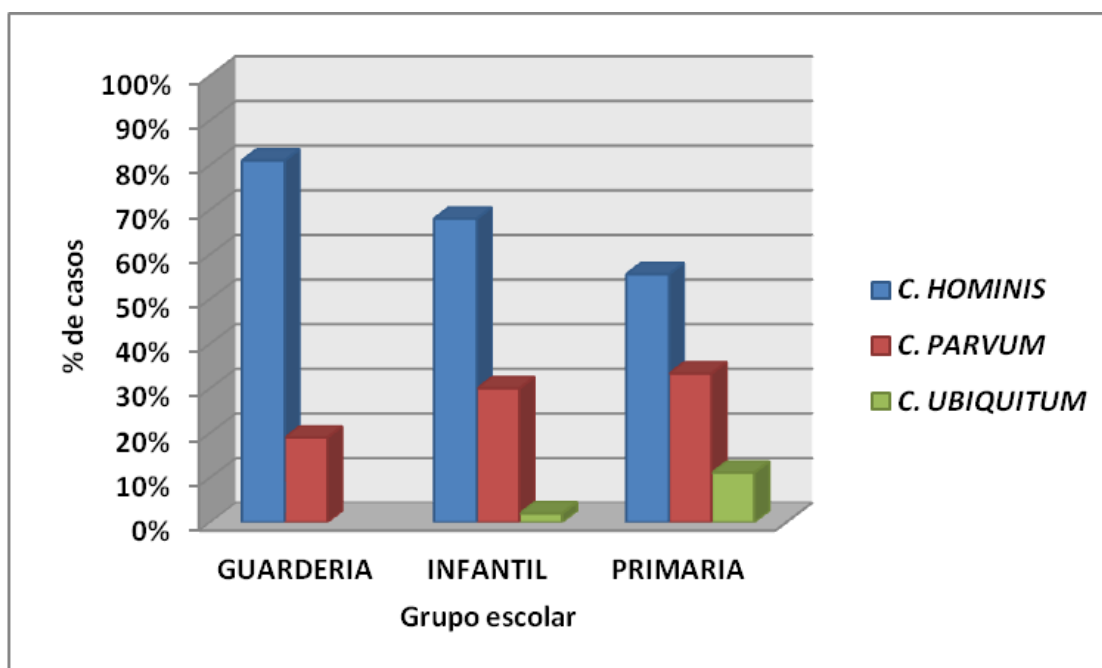


Figura 13. Distribución de los casos de cryptosporidiosis según el intervalo de edad escolar de los pacientes de la muestra.

Otras asociaciones

No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas cuando se analizaron factores como género, ni entre género y especie ni entre género y desarrollo de la infección, ni tampoco entre especie y género o especie y síntomas.

No obstante, se observó que el número de casos de cryptosporidiosis por *C. hominis*, se distribuyó de igual manera (50% y 50%) entre varones y mujeres mientras que en el caso de *C. parvum* se observó un número más elevado de casos en varones que en mujeres (69% y 31% correspondiente) (Figura 14).

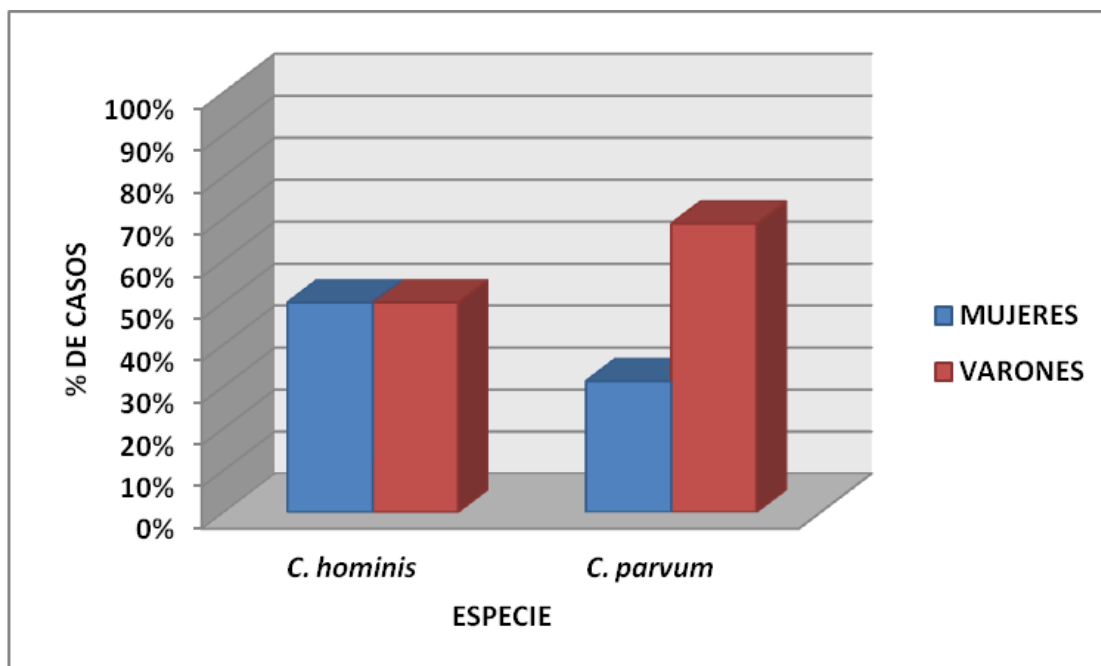


Figura 14. Distribución de los casos de cryptosporidiosis por género.

Identificación de subtipos de *Cryptosporidium*

Mediante de la técnica de PCR para amplificar un fragmento del gen que codifica para la glicoproteína GP60, se subgenotiparon un total de 102 muestras: 80 de *C. hominis* (38 de Zaragoza, 35 de León y 7 Granada) y 22 *C. parvum* (4 de Zaragoza y 18 de León). Dos de las muestras no se pudieron subgenotipar.

Utilizando la nomenclatura descrita por Sulaiman et al. (2005), se han identificado 18 subtipos diferentes (4 pertenecían a la familia Ib, 1 a la familia Ia, 1 a la familia Ie, 1 a la familia If, 6 a la IId y 5 a la familia IId) (Figura 15).

El subtipo IaA11R2 fue encontrado en 6 pacientes de Granada y no había sido descrito hasta la fecha. En uno de los subtipos de la familia Ib no se consiguió amplificación de la parte de la secuencia que contiene las repeticiones de trinucleótidos características de cada subtipo. Sin embargo, el fragmento obtenido reflejó un 100% de homología con el subtipo IbA10G2R2 registrado en la base de datos del GenBank (KJ910024.1).

La familia del genotipo más prevalente en este estudio fue la Ib. Se ha encontrado en un total de 72 muestras, de las cuales 67 contenían el subtipo IbA10G2R2.

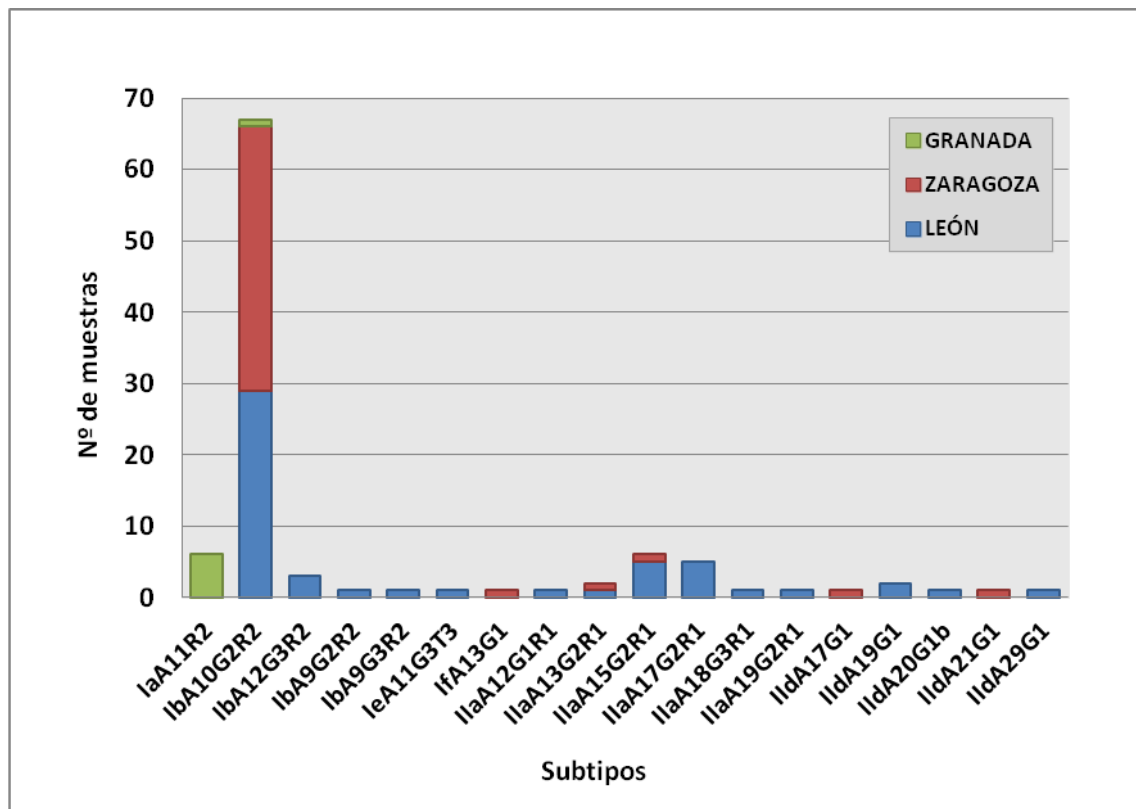


Figura 15. Distribución de los subtipos de *Cryptosporidium*.

Los subtipos encontrados, su procedencia, ámbito y año de extracción de la muestra se muestran en la tabla 3.

El subtipo IbA10G2R2 de *C. hominis* fue el más común. Se encontró en 37 pacientes de Zaragoza, 29 de León y 1 de Granada. En 3 muestras de León se identificó *C. hominis* subtipo IbA12G3R2. Las muestras presentaron una homología del 99% entre ellas y con la secuencia registrada como GU214349 en el GenBank. En menor proporción, con una muestra de cada uno de ellos y procedentes de León, se detectaron los subtipos siguientes: IbA9G3R2 (presenta 97% de homología con las secuencias registradas en el GenBank con números EU379545 y GU214347), IbA9G2R2 (homología del 98% con la secuencia con número de registro FJ861213) y IeA11G3T3 (presenta un 98% de homología con la secuencia del GenBank DQ192509). En Zaragoza, aparte de subtipo IbA10G2R2, se ha encontrado un subtipo de *C. hominis*

más y en solo una muestra denominado IfA13G1 (presenta 100% de homología con secuencia de GenBank nr JF268641). Es un subtipo que se describe por primera vez en Europa.

En el caso de *C. parvum* se ha encontrado 11 diferentes subtipos. En Zaragoza se identificaron los siguientes 4 subtipos, detectando una muestra con cada uno de ellos: IIA13G2R1, IIA15G2R1, IIdA17G1 y IIdA21G1. En León, en mayor proporción se encontraron dos subtipos de *C. parvum*, el IIA15G2R1 y el IIA17G2R1, cada uno en 5 muestras y el subtipo IIdA19G1 en 2 muestras. En menor proporción se encontraron los subtipos IIA18G3R1, IIA19G2R1, IIdA20G1b, IIdA29G1, identificando cada uno de ellos en una muestra. El subtipo IIA18G3R1 presenta una homología de 99% con *C. parvum* procedente de una muestra de heces de ganado, identificado en Aragón por Quilez et al., entre años 2006 y 2007 y a su vez con la muestra registrada en base de datos del GenBank con número DQ192508. *Cryptosporidium parvum* subtipo IIA13G2R1 fue identificado en una muestra procedente de León, y su secuencia presentó un 100% de homología con el subtipo registrado en GenBank en Holanda por Wielinga et al., en el año 2008 con número EF576971. Para el mismo subtipo identificado en una muestra procedente de Zaragoza, se obtuvo una secuencia con un 99% de homología con esta misma secuencia de Gen Bank.

De las muestras de la familia IId, 3 de ellas presentan una homología muy alta con otras muestras registradas en base de datos. La secuencia obtenida para el subtipo IIdA17G1 presenta una homología 98% con la secuencia registrada con número HQ149040, identificada en Inglaterra, la obtenida para el subtipo IIdA20G1b presenta homología de 99% con la secuencia registrada con número FJ917375 de Suecia y por último la secuencia obtenida para el subtipo IIdA29G1 identificado en este estudio, tiene una homología del 99% con la secuencia registrada como GU458803 y obtenida a partir de muestras procedentes de Jordania.

El subtipo IbA10G2R2 identificado en 67 muestras, constituye el 64,7% de todos los subtipos y el 82,5% de los subtipos de *C. hominis* identificados en este estudio. En Zaragoza, todos los aislamientos de *C. hominis* excepto uno pertenecen a este subtipo. En León el subtipo IbA10G2R2 se encuentra en el 80% de las muestras con *C. hominis*.

En el ámbito urbano habitaban el 64,2% (43 muestras) de los pacientes en los que se identificó el subtipo IbA10G2R2, mientras que en el ámbito rural solo supusieron el 26,9% (18 muestras). Además, este es el único subtipo de *C. hominis* que se encontró en ámbito rural. El 8,9% de las muestras con *Cryptosporidium* subtipo IbA10G2R2 carecían de datos del ámbito de procedencia. Considerando la frecuencia en que se encontraron, siguen al ya mencionado en prevalencia los subtipos IaA11R2, el IIaA15G2R1 y el IIaA17G2R1, habiendo identificado el primero de ellos en 6 muestras, en dos de las cuales se diagnosticó co-infección con *Giardia duodenalis*. Los aislamientos de *Cryptosporidium* subtipo IIaA15G2R1 detectados en 6 muestras, 5 de ellas procedentes de León y una de Zaragoza, presentaron una homología de entre 99% y 100% en sus secuencias del gen *gp60*. La muestra de Zaragoza presenta además una homología de 100% con la secuencia de *C. parvum* aislada en Zaragoza y procedente de ganado, publicada en el año 2008 por Quilez et al., que a su vez presenta homología 100% con la secuencia registrada en la base de datos GenBank con número AY738190. El otro subtipo de *C. parvum*, el IIaA17G2R1, encontrado en 5 muestras procedentes de León presentó una homología de entre 98% y 100% (3 muestras) entre las secuencias obtenidas para el fragmento amplificado del gen *gp60*. Las secuencias con homología 100% presentan también homología 100% con las correspondientes al subtipo encontrado por Quilez et al., en 2008 en ganado en Aragón y que a su vez presenta 100% de homología con la secuencia ingresada en base de datos con número DQ192507 que procede de ganado de Ontario.

Todos los subtipos con su procedencia, ámbito y año de extracción se muestran en la Tabla 3

Tabla 3. Subtipos de *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* identificados y su relación con procedencia, ámbito y año de extracción de la muestra.

Especie	Genotipo	Subtipo	Nº de casos	Otros datos de interés		
				Ciudad	Ámbito	Año
<i>C. hominis</i>	Ia	IaA11R2	6	Granada	Urbano	2013
	Ib	IbA10G2R2	67	León (29) Zaragoza (37) Granada (1)	Rural (18) Urbano (43)	2006-2013
		IbA12G3R2	3	León	Urbano	2009
		IbA9G2R2	1	León	Urbano	2008
		IbA9G3R2	1	León	Urbano	2009
	Ie	IeA11G3T3	1	León	Urbano	2010
	If	IfA13G1	1	Zaragoza	Urbano	2011
<i>C. parvum</i>	IIa	IIaA15G2R1	6	León (5) Zaragoza (1)	Urbano	2012
		IIaA17G2R1	5	León	Urbano	2008 (4) 2009 (1)
		IIaA18G3R1	1	León	Urbano	2008
		IIaA19G2R1	1	León	Urbano	2009
		IIaA13G2R1	2	León Zaragoza	Urbano	2011 2013
		IIaA12G1R1	1	León	Urbano	2012
	IIId	IIIdA20G1b	1	León	Rural	2010
		IIIdA21G1	1	Zaragoza	-	-
		IIIdA29G1	1	León	Urbano	2007
		IIIdA19G1	2	León	Rural	2013
		IIIdA17G1	1	Zaragoza	Urbano	2012

Asociaciones con subtipos de *Cryptosporidium* y otros factores.

No se han encontrado asociaciones estadísticamente significativas entre subtipo y estacionalidad, ni entre subtipo y edad. Sin embargo, sí que se han apreciado algunas tendencias analizando subtipos por edad, año o mes de aislamiento de la muestra.

Edad de los pacientes

La distribución de subtipos por edad de los pacientes se puede observar en la figura 16.

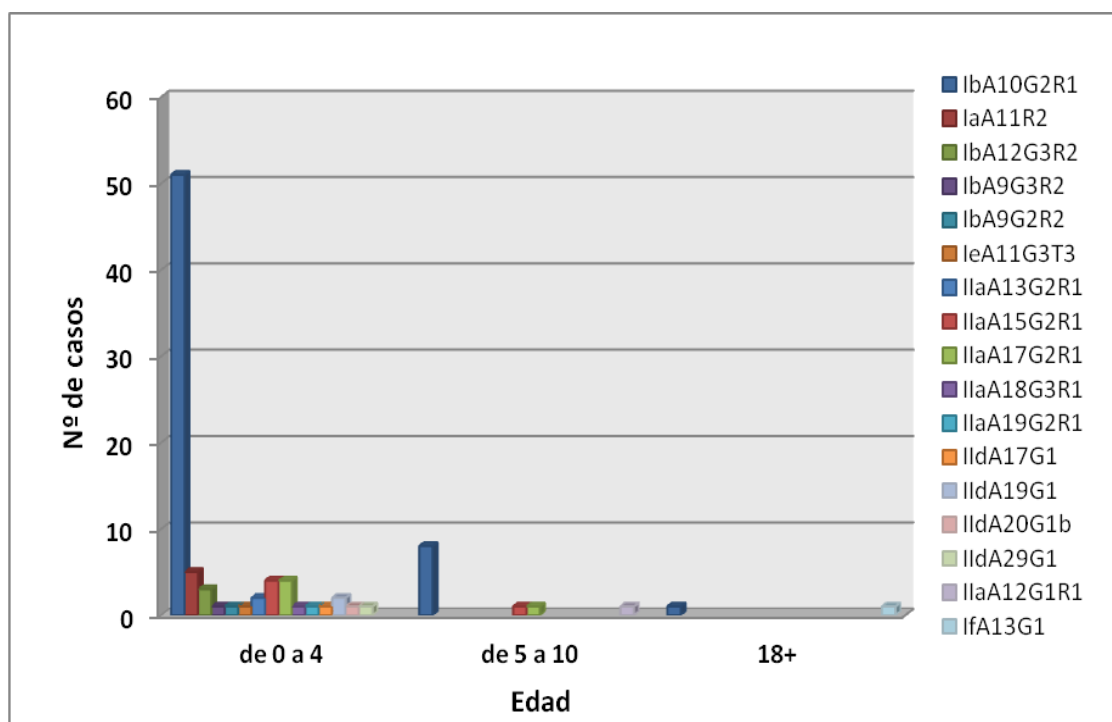


Figura 16. Distribución de los subtipos identificados de *Cryptosporidium* por edad de los pacientes de todas las muestras.

Año de aislamiento

La distribución de subtipos según el año en que se extrajo la muestra se puede observar en la figura 17.

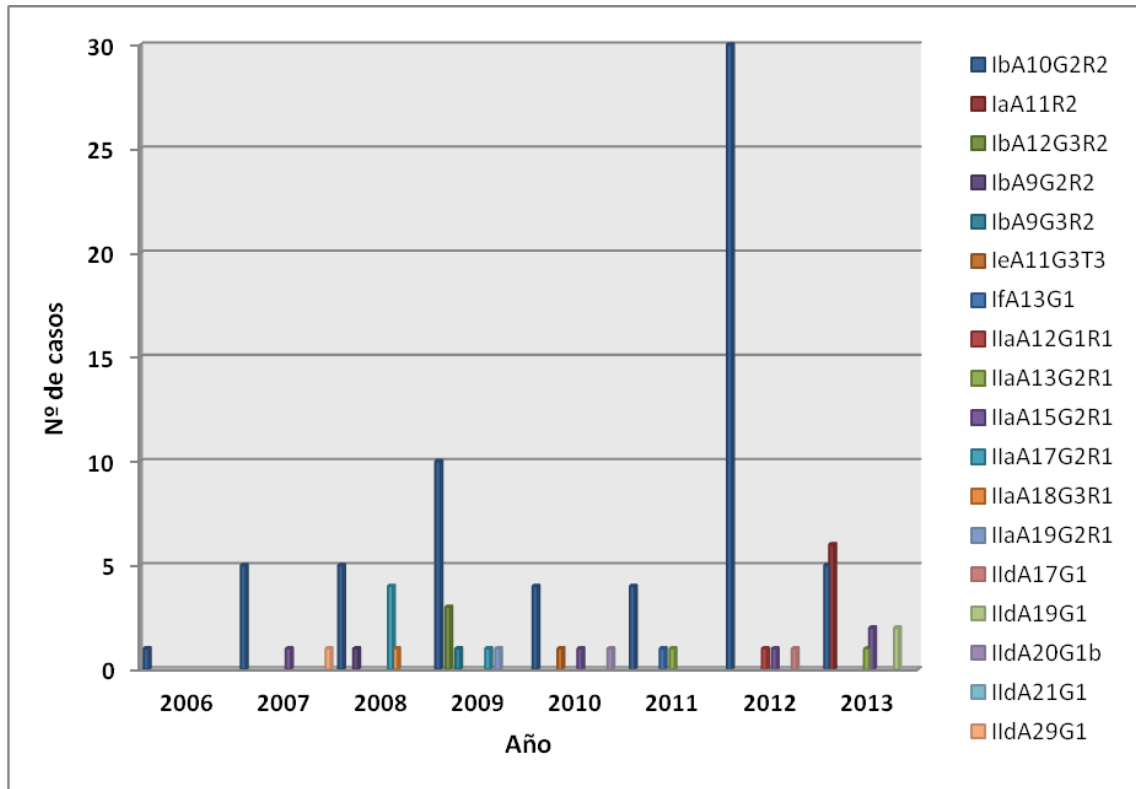


Figura 17. Distribución de los subtipos identificados de *Cryptosporidium* según el año de su aislamiento.

Mes de aislamiento

La distribución de subtipos por mes de recogida de la muestra se puede observar en la figura 18.

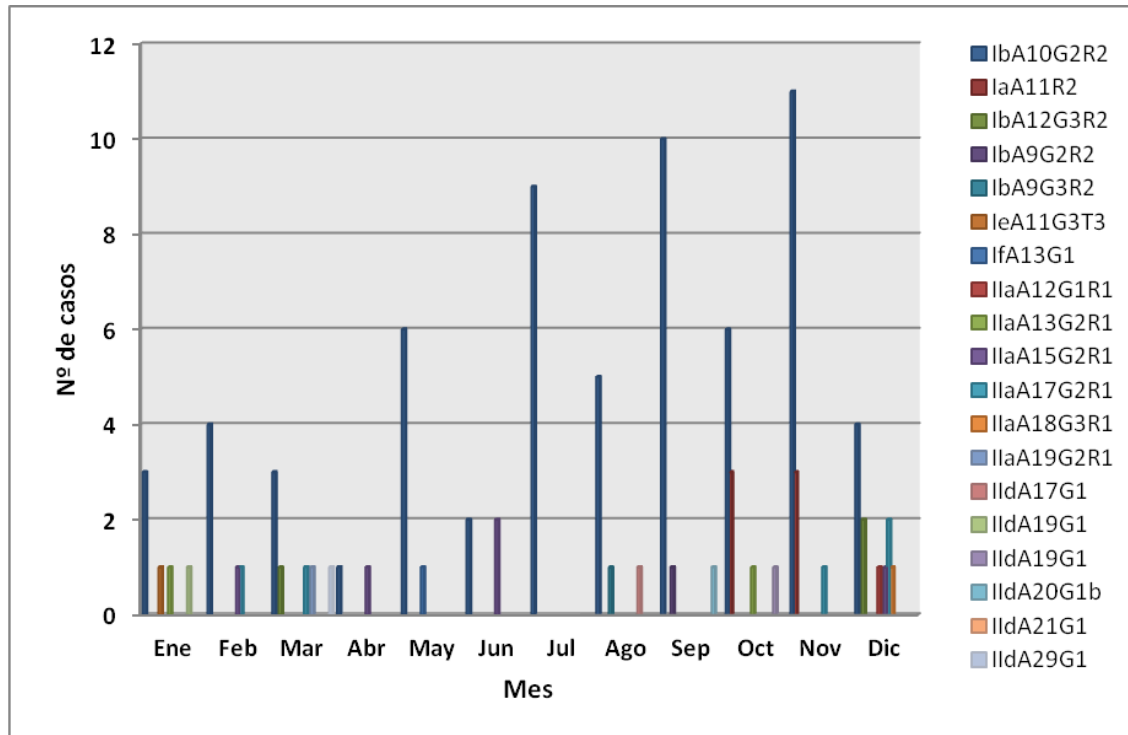


Figura 18. Distribución de los subtipos identificados de *Cryptosporidium* en toda la muestra, según el mes de su aislamiento.

Estructura de las poblaciones de *Cryptosporidium* circulantes por ciudades.

León

Distribución de los casos según su origen

Respecto a las muestras procedentes de León, el 22,5 % (18/80) de los pacientes habitaban en el medio rural, el 72,5 % (58/80) en el medio urbano y hay un 5 % (4/80) de los que se desconoce el origen (Figura 19).

En el medio rural, el 55,5 % (10/18) de las muestras contenía *C. hominis*, el 38,9 % (7/18) *C. parvum* y el 5,5 % (1/18) *C. ubiquitum*. En el medio urbano, el 62,1 % (36/58) de los aislamientos correspondió a *C. hominis* y el 37,9 % (22/58) a *C. parvum* (Figura 20). *Cryptosporidium ubiquitum* se identificó en la muestra de un niño de 6 años, residente en la provincia de León, que acudió al Hospital de León con dolor abdominal. El niño vivía en el área urbana pero pasaba mucho tiempo en el campo con sus abuelos que criaban ovejas. Su familia confirmó el contacto del niño con ganado ovino (Cieloszyk et al., 2012). No se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre entorno ambiental y especie de *Cryptosporidium* en León ($p > 0.05$).

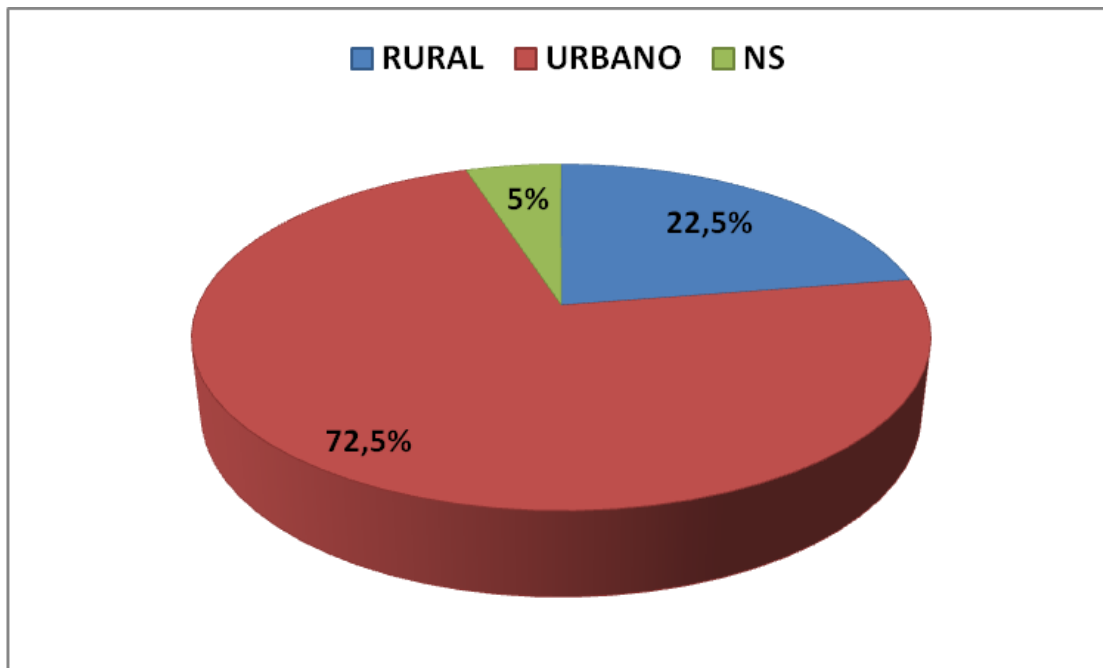


Figura 19. Distribución de casos por ámbito en León.

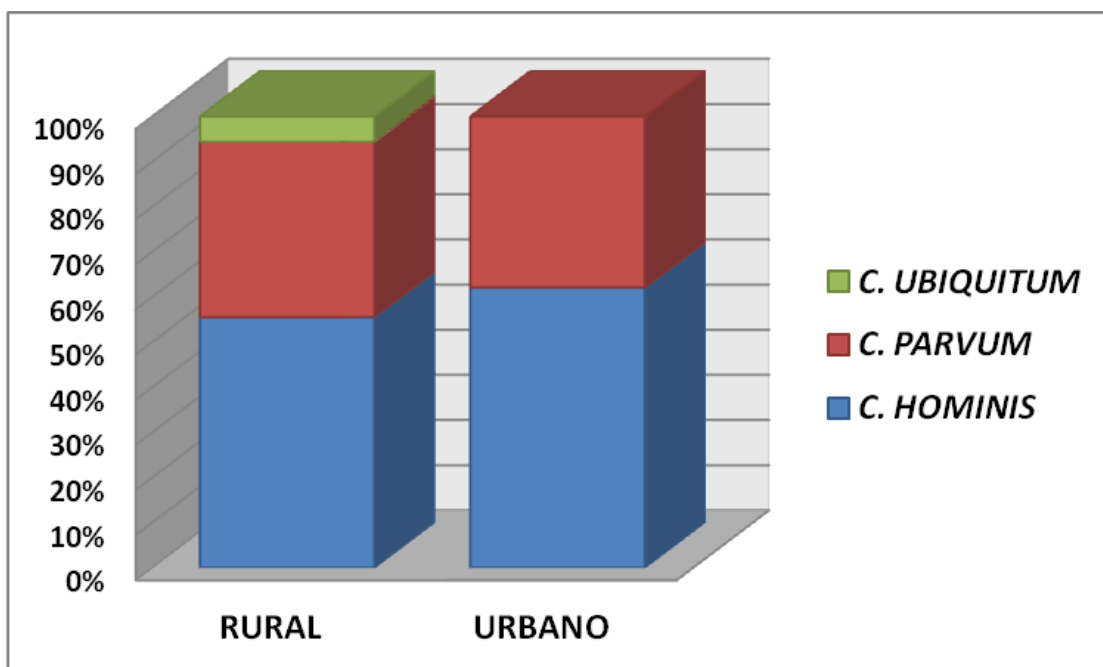


Figura 20. Distribución de las especies de *Cryptosporidium* por ámbito en León.

Estacionalidad

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre estacionalidad y número de casos de cryptosporidiosis diagnosticados. Sin embargo, igual que ocurría cuando el estudio se realizaba con la muestra en su totalidad, se observa un aumento de los casos en el tercer cuatrimestre, aunque en este caso se produce una disminución de los casos en el segundo cuatrimestre respecto al primero (Figura 21).

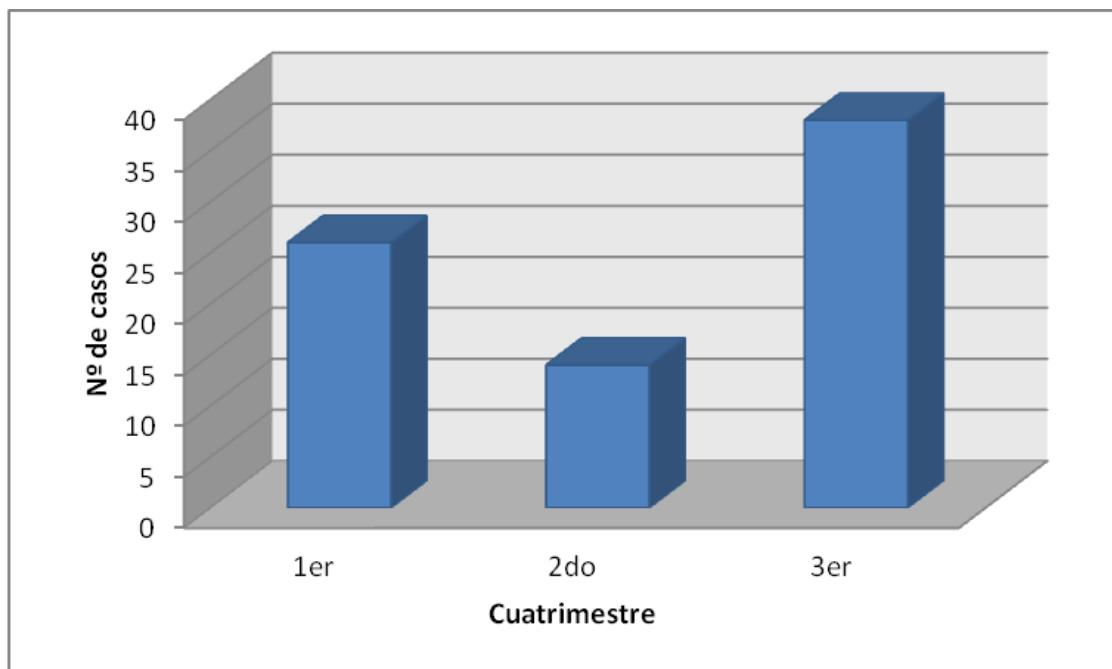


Figura 21. Distribución de los casos de cryptosporidiosis por cuatrimestres en la ciudad de León.

Asociaciones con subtipos

Edad de los pacientes

La distribución de subtipos por edad de los pacientes en León se puede observar en la figura 22.

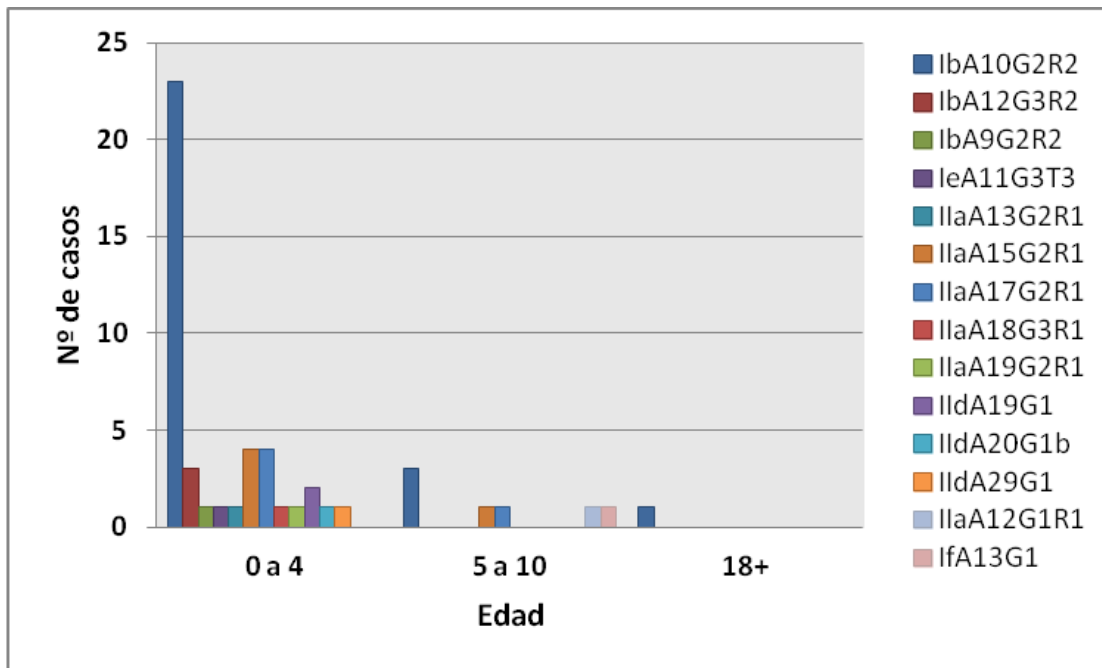


Figura 22. Distribución de los subtipos de *Cryptosporidium* identificados por edad de los pacientes de la ciudad de León.

Año de aislamiento

La distribución de subtipos por el año en que se recogió la muestra en León se puede observar en la figura 23.

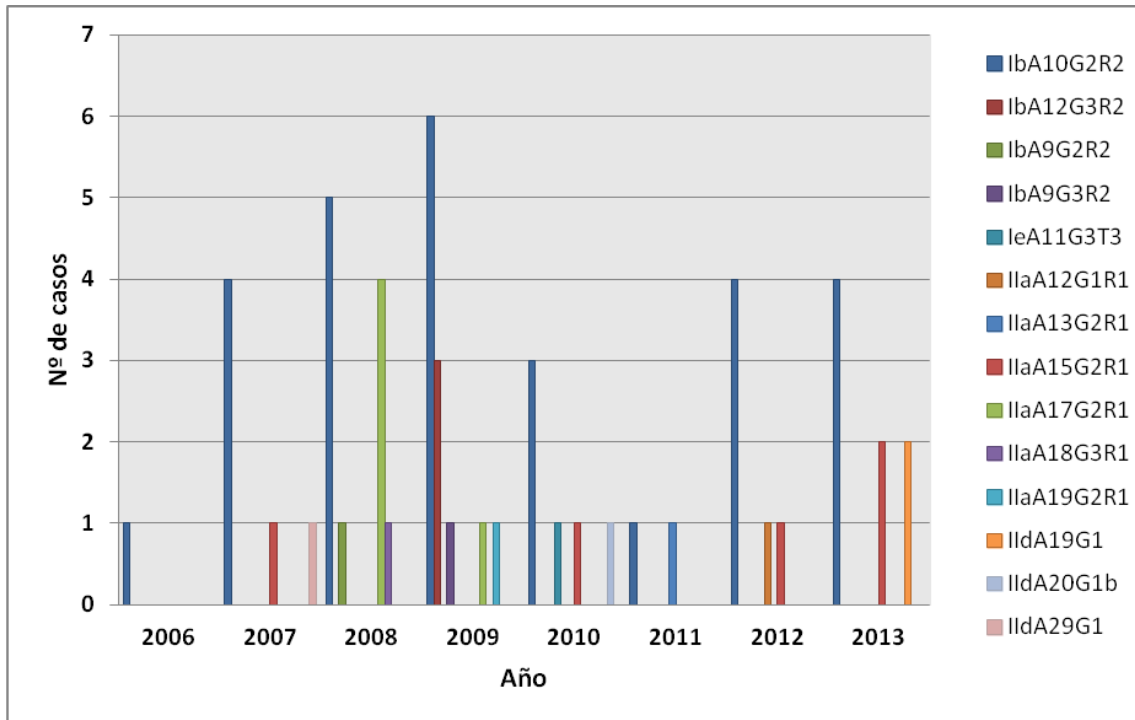


Figura 23. Distribución de los subtipos identificados de *Cryptosporidium* aislados en León, según su año de aislamiento.

Mes de aislamiento

La distribución de subtipos por mes de aislamiento de la muestra en León se puede observar en la figura 24.

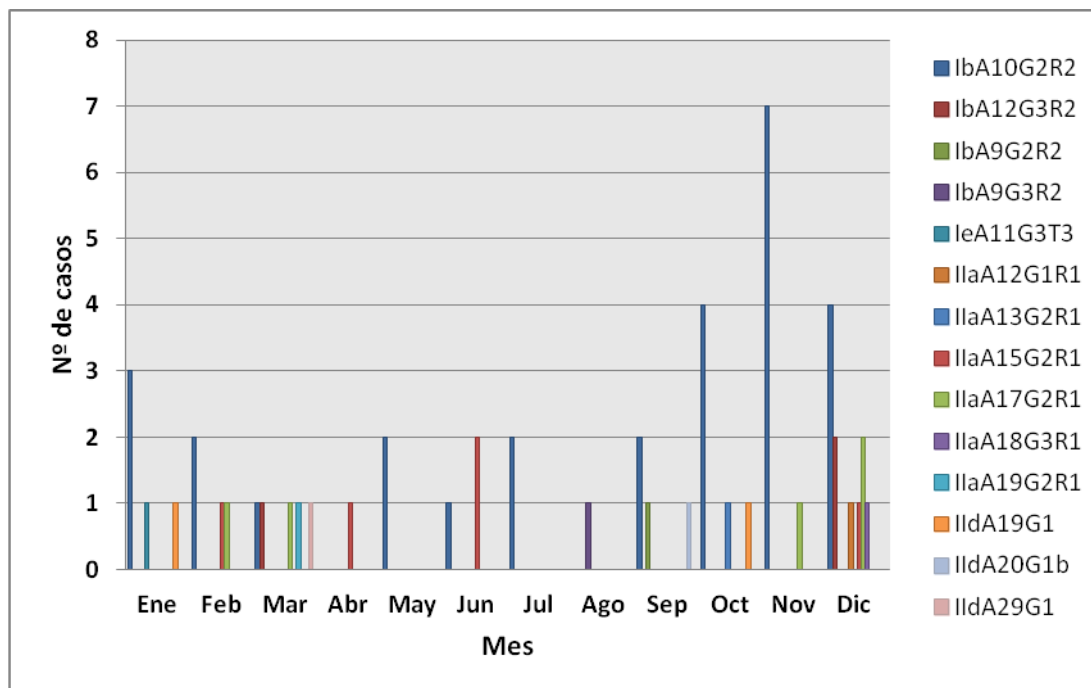


Figura 24. Distribución de los subtipos identificados de *Cryptosporidium* en la ciudad de León, según el mes de su de aislamiento.

Debido a la elevada prevalencia del subtipo IbA10G2R2 en León se procedió a llevar a cabo un estudio de estacionalidad del mismo, analizando su frecuencia por año y mes (Figura 25).

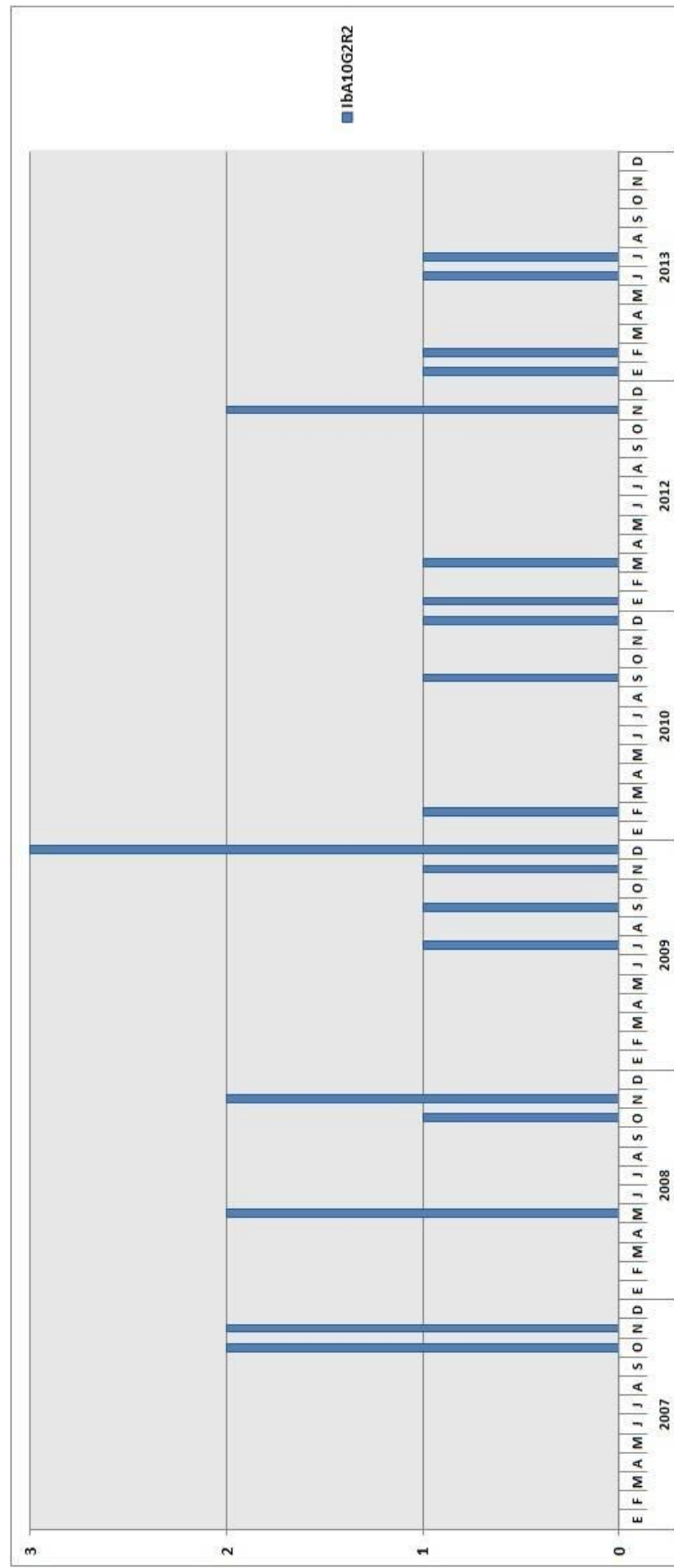


Figura 25. Distribución del subtipo IbA10G2R2 en la ciudad de León según el mes y año de su aislamiento.

Asimismo, se analizó la frecuencia del subtipo IIaA17G2R2 por año y mes de aislamiento, detectado en León en 5 casos (Figura 26).

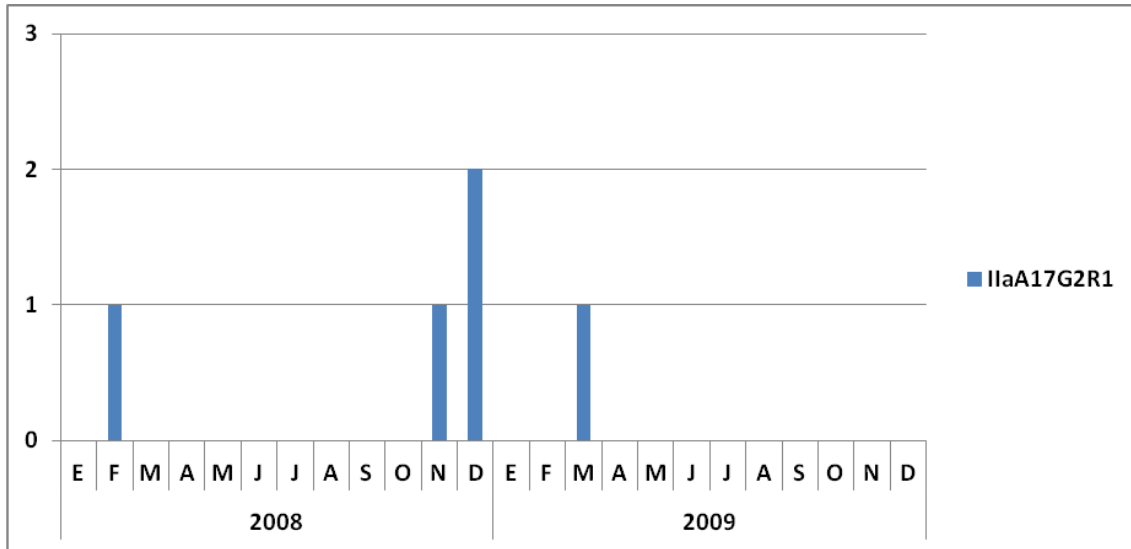


Figura 26. Distribución del subtipo IIaA17G2R1 en la ciudad de León según el mes y año de su aislamiento.

Zaragoza

Distribución de los casos según su origen

En Zaragoza, del total de los pacientes cuyas muestras resultaron positivas para *Cryptosporidium* spp., el 39,1% (25/64) habitaba en el medio rural, el 50% (32/64) en el medio urbano y del 10,9% (7/64) restante se desconoce el origen (Figura 27).

En el medio rural, el 92% (23/25) de las muestras contenían *C. hominis*, el 4% (1/25) *C. parvum* y el 4% (1/25) *C. felis*. En el medio urbano, el 87,5% (28/32) de los aislamientos se caracterizó como *C. hominis*, el 9,4% (3/32) como *C. parvum* y el 3,1% (1/32) como *C. ubiquitum* (Figura 28). La muestra de *C. ubiquitum* corresponde a un niño de 4 años de nacionalidad rumana que vivía en la provincia de Zaragoza en el ámbito urbano y la de *C. felis* a un varón de 49 años, VIH positivo, que vivía en el área rural de Zaragoza y acudió al hospital con diarrea de un mes de duración, pérdida de peso, disfagia, fiebre esporádica y malestar general. Además de cryptosporidiosis también fue diagnosticado de candidiasis esofágica y se identificó *Blastocystis hominis* en la muestra (Cieloszyk et al., 2012).

No se ha encontrado la asociación estadísticamente significativa entre entorno y especie de *Cryptosporidium* en Zaragoza ($p > 0,05$).

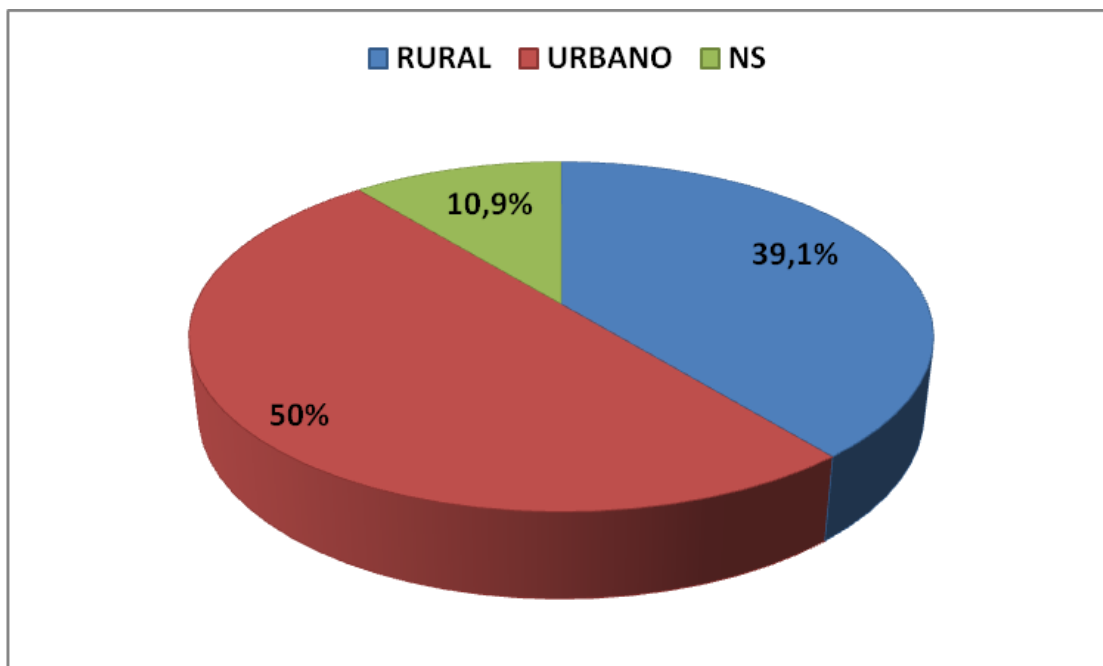


Figura 27. Distribución de casos de cryptosporidiosis por ámbito en Zaragoza.

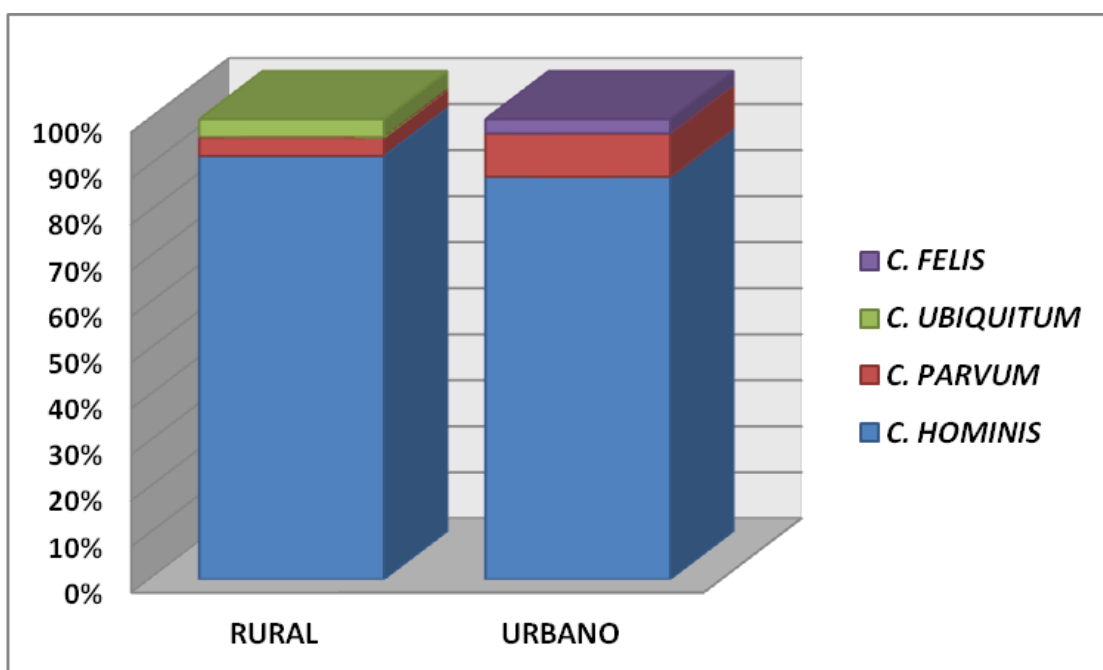


Figura 28. Distribución de especies de *Cryptosporidium* por ámbito en Zaragoza.

Estacionalidad

En Zaragoza, se produce el mayor número de casos durante el segundo cuatrimestre del año, manteniéndose más alto durante el tercer cuatrimestre respecto al primero (Figura 29).

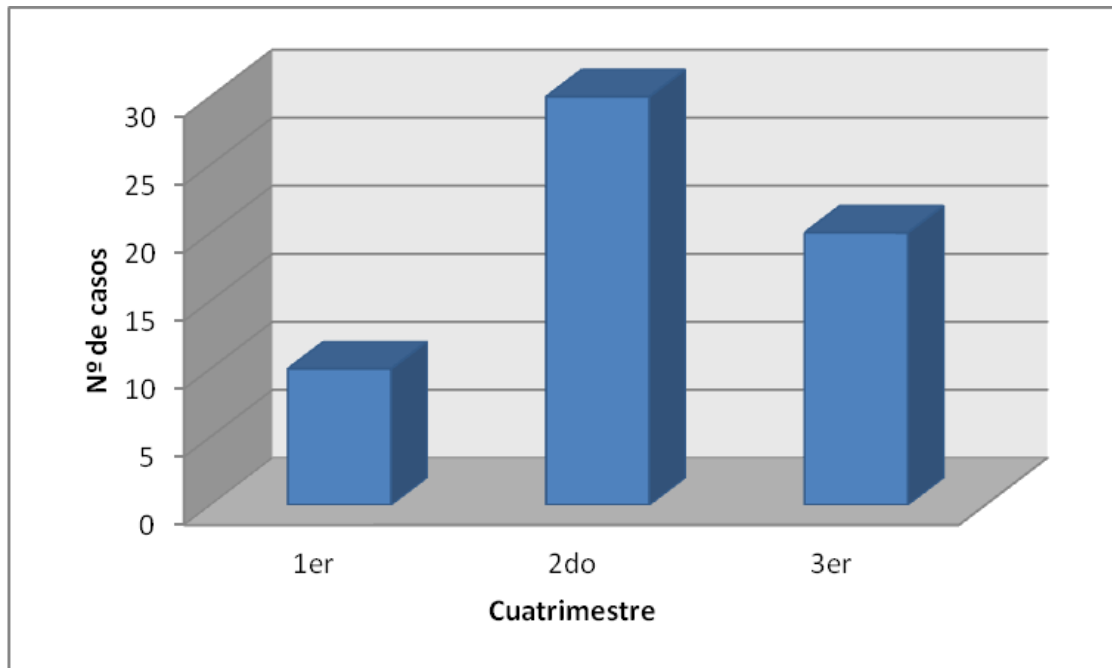


Figura 29. Distribución de los casos de cryptosporidiosis por cuatrimestres en la ciudad de Zaragoza.

Asociaciones entre subtipos y los factores estudiados

Edad de los pacientes

La distribución de subtipos por edad de los pacientes en Zaragoza se puede observar en la figura 30.

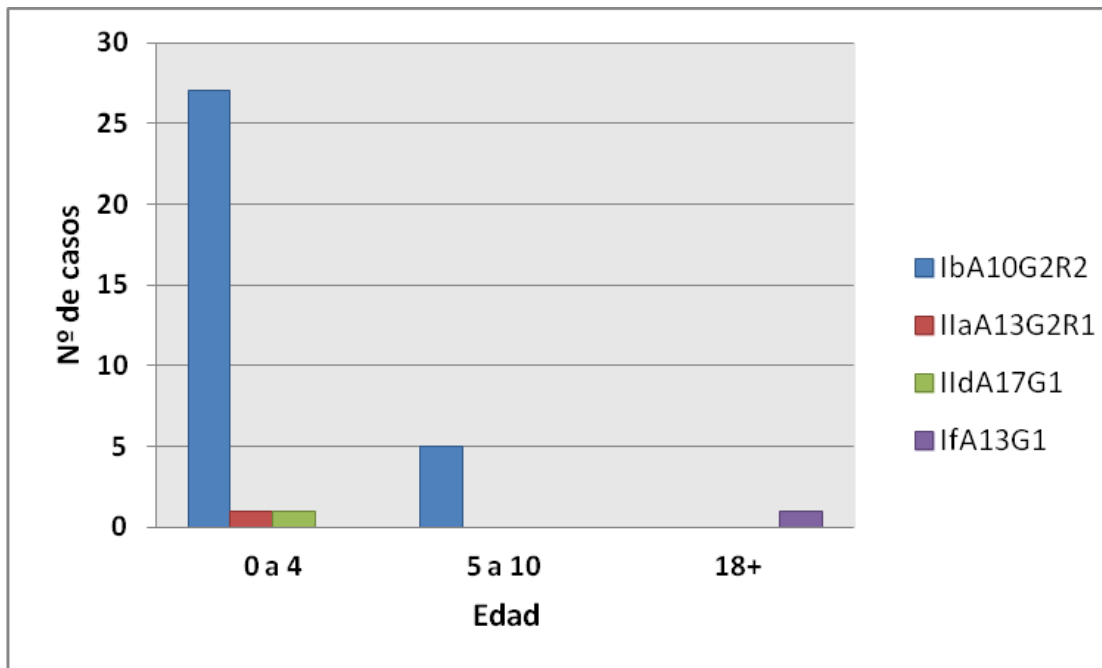


Figura 30. Distribución de los subtipos identificados de *Cryptosporidium* por edad de los pacientes de la ciudad de Zaragoza.

Año de aislamiento

La distribución de subtipos por años en los que se recogió la muestra en Zaragoza se puede observar en la figura 31.

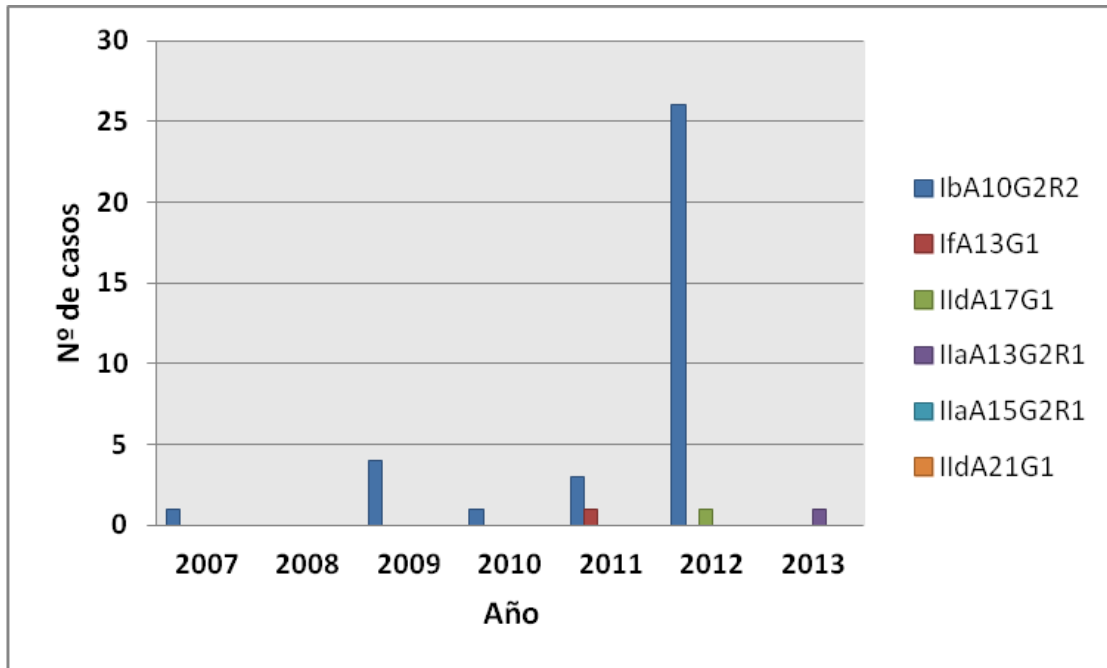


Figura 31. Distribución de los subtipos identificados de *Cryptosporidium* aislados en Zaragoza, según su año de aislamiento.

Mes de aislamiento

La distribución de subtipos por mes de aislamiento de la muestra en Zaragoza se puede observar en la figura 32.

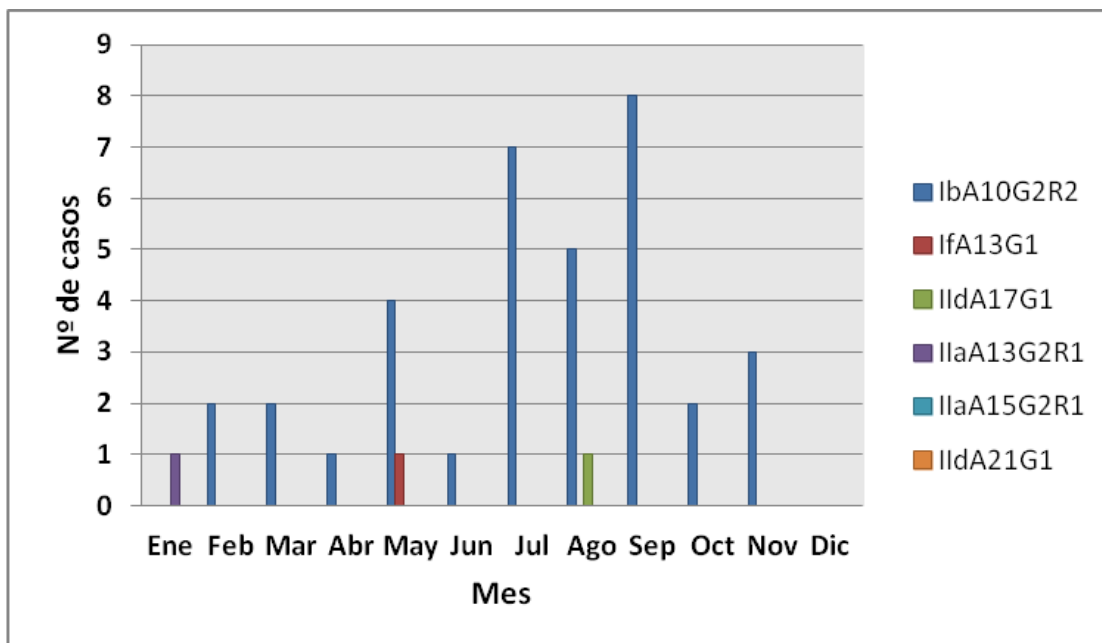


Figura 32. Distribución de los subtipos identificados de *Cryptosporidium* en la ciudad de Zaragoza, según el mes de su de aislamiento.

Debido a la elevada prevalencia del subtipo IbA10G2R2 en Zaragoza, se procedió a realizar un estudio de estacionalidad del mismo, analizando su frecuencia por año y mes (Figura 33).

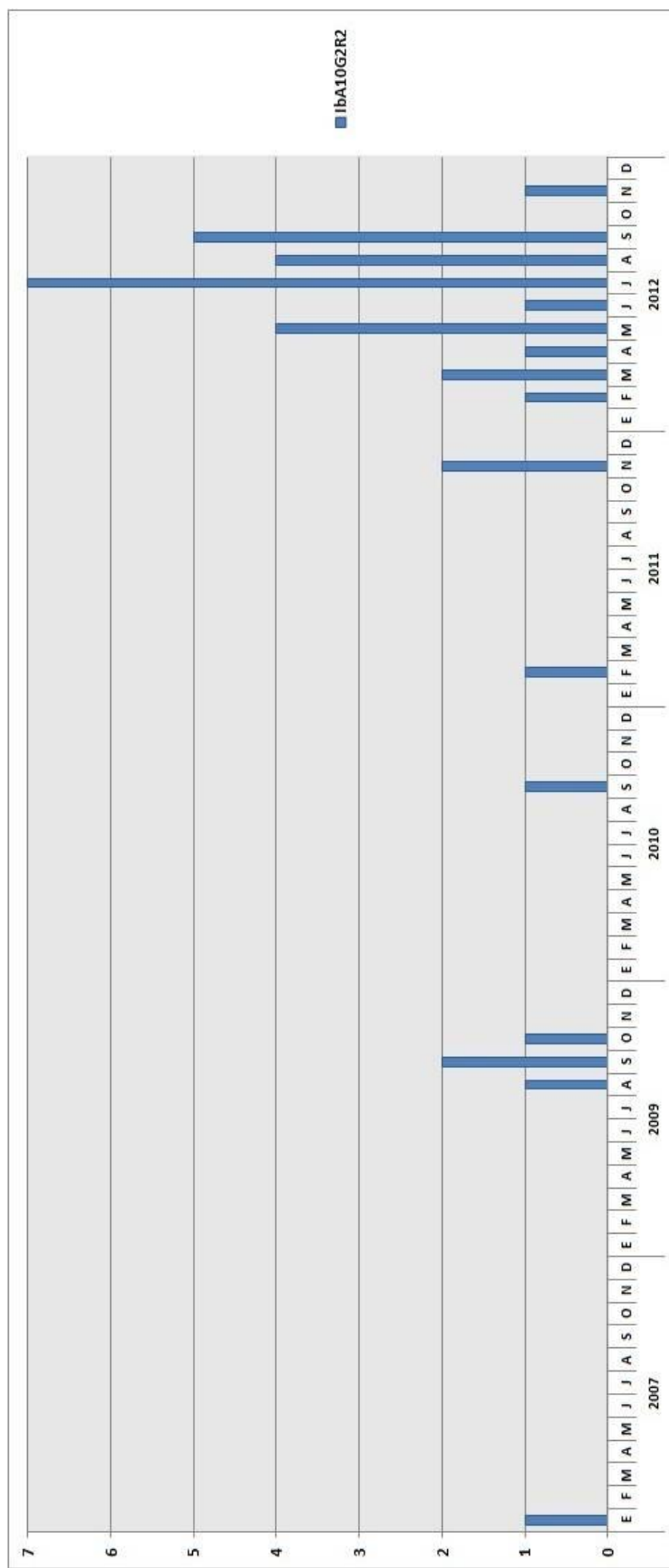


Figura 33. Distribución del subtipo IbA10G2R2 en la ciudad de Zaragoza según el mes y año de su aislamiento.

Granada

Procedentes de la provincia de Granada, se estudiaron 9 casos, 7 de los cuales correspondían a un brote en una guardería y todos ellos resultaron ser *C. hominis*.

De los 7 casos del brote 5 fueron identificados como subtipo IaA11R2, uno como IbA10G2R2 y el restante no se pudo secuenciar.

El análisis de las secuencias obtenidas por amplificación de un fragmento del gen de *SSUrRNA* en las muestras de Granada con el subtipo IaA11R2, demostró que dichas secuencias eran idénticas entre sí, mientras que las obtenidas para el fragmento de gen que codifica la glicoproteína GP60 presentaron las homologías entre el 99.4% y el 100%.

Las sustituciones nucleotídicas puntuales (SNP) encontradas en estas secuencias no afectaron a la región variable de repeticiones en tándem de los trinucleótidos que codifican para serina (TCA/TCG/TCT).

Los cambios en los nucleótidos han sido los siguientes: en la secuencia correspondiente a *C. hominis* IaA11R2 procedentes de la muestra 194 un cambio en el nucleótido 227 de C a A implica una sustitución en la proteína en la posición 85, de S a Y; en la secuencia correspondiente al aislamiento detectado en la muestra 182, la sustitución de C a T en las posiciones 305 y 308 de la secuencia de nucleótidos, implicó el cambio en la proteína de T a I, de los aminoácidos en posiciones 102 y 103. Los resultados obtenidos se publicaron en la revista *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Goñi et al., 2015).

Las circunstancias particulares y el bajo número de las muestras procedentes de Granada, no permitieron realizar estudios de asociaciones con factores sociodemográficos.

Estudio de las secuencias obtenidas

Además del estudio epidemiológico, se procedió a llevar a cabo el estudio de epidemiología molecular de las secuencias obtenidas en el estudio, agrupándolas por subtipos.

Subtipos de *Cryptosporidium hominis* caracterizados en el estudio

IbA10G2R2

En el estudio se caracterizaron un total de 67 aislamientos correspondientes a este subtipo, representando por lo tanto un 65,7% del total de los aislamientos caracterizados. Para 55 de ellos se logró secuenciar un fragmento de 319 pb del gen *gp60*, presentando las secuencias entre sí homologías entre el 93% al 100%.

Cuarenta secuencias presentaron un 100% de homología y pertenecen a 26 aislamientos de muestras de Zaragoza y 14 de León. En la figura 34 se muestra la secuencia nucleotídica obtenida para estas muestras y en la figura 35 la secuencia de la proteína que codifica.

```

      10      20      30      40      50
9H  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AAAGATGTTTCTGTGAGAGCTCATCATCATCATCATCATCGTCATC
      60      70      80      90     100
9H  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    ATCGTCAACAACAACCCCGCACCAGCTCCAAGAAGGCAAGAGAAGCAG
      110     120     130     140     150
9H  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    ATGGCGGAGAAGAAAAGAACAATGAAGAAAGCCAAACTCCCCTAGTCCT
      160     170     180     190     200
9H  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    GGAAGTGGTGGGGTGAGTGAAGGACAAGATACTCAAGGTGGCTCCAAAGG
      210     220     230     240     250
9H  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    AGACGCTGAGGAAGGCACCTGAAGACAATGAACAAGCCGATGAGAGTGCTA
      260     270     280     290     300
9H  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    CCCAACCTTCTACCCAGGTCAGGGCTCCGTAAAACCGAATCCACAGAA
      310     320
9H  ....|....|....|....|
    ACTACTCCAAAGGAG-AAGT

```

Figura 34. Secuencia nucleotídica tipo del fragmento amplificado del gen *gp60* para el subtipo IbA10G2R2, encontrada en 40 muestras.

```

      10      20      30      40      50
9H  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    SAPAVPLRGTCLKDVSVESSSSSSSSSSSSTTTPAPAPKKAREADGGEEK
      60      70      80      90     100
9H  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    NNEESQTPASPGSGGVSEGQDTQGGSKGDAEEGTEDNEQADESATQPSPTP
      110
9H  ....|....|....|....|
    GQGSVKTESTETTPKEK

```

Figura 35. Secuencia tipo de la proteína que codifica el fragmento amplificado del gen *gp60* para el subtipo IbA10G2R2, encontrada en 40 muestras.

Las 15 secuencias restantes con homología entre 93 % y 99.6% pertenecieron a 11 aislamientos de muestras de Zaragoza, 3 de León y 1 de Granada. En ellas no se encontraron sustituciones nucleotídicas puntuales (SNP) en la región de las repeticiones de trinucleótidos que codifican serina (TCA/TCG/TCT).

Las otras sustituciones ubicadas fuera de la región repetitiva y las sustituciones que a su vez provocan en la proteína se muestran en las tablas 4 y 5.

En las muestras 103H y 165H aparecen delecciones de nucleótidos que provocan cambios en la proteína (11% y 5% de la proteína correspondiente). En la muestra 103H la delección de la timina en la posición 281 y una sustitución de adenina por timina en la posición 294 provocaron un cambio de 11 aminoácidos en la posición 96-106 de la proteína. De forma similar, en la muestra 165H los cambios de nucleótidos provocaron una cadena de cambios en la proteína de 5 aminoácidos.

Las secuencias obtenidas para los aislamientos de las muestras 92H, 93H y 192G presentan una homología del 93-94% con las otras muestras. Las SNPs identificadas en sus secuencias se muestran en la tabla 5. En el caso del aislamiento contenido en la muestra 92H, la presencia de 18 SNPs, solamente dio lugar a la sustitución de un aminoácido en la proteína. Por otro lado, en el de la muestra 93H ninguno de los 15 cambios de nucleótidos provocó sustituciones de aminoácidos en la proteína. La secuencia obtenida en la muestra 192G que es la única con *Cryptosporidium* subtipo IbA10G2R2 procedente de Granada, presentó una homología del 93% con las otras secuencias de este subtipo, que se tradujeron en 21 cambios de nucleótidos de los cuales solo 2 no dan lugar a sustitución de aminoácidos en la proteína.

Tabla 4. SNP (sustituciones nucleotídicas puntuales) en las secuencias IbA10G2R2 con homologías del 95 % - 99% y los cambios resultantes en la proteína que codifican.

MUESTRA	NUCLEÓTIDO		PROTEÍNA	
	Cambio	Posición	Cambio	Posición
5 H	A → G	91	R → G	31
42 H	Sin cambios			
47 H	A → G	304	T → A	102
94 H	G → T	247	A → S	83
	C → T	279	-	-
	A → T	286	T → S	96
	A → T	311	K → M	104
103 H	C → T	248	A → V	83
	T → Ø*	281	TESTETTPKEK ↓ PNPQKLLQRRS	96 - 106
	A → T	294		
114 H	A → T	311	-	-
115 H	G → T	247	A → S	83
	A → G	311	K → R	104
156 H	C → T	248	A → V	83
165 H	A → Ø	303	TPKEK ↓ LQESD	102 - 106
	AG → GA	310-311		
	ØAAGT → CØGAC	315-318		
37 L	Ø → T	316	-	-
66 L	A → G	304	T → A	102
108 L	G → T	247	A → S	82
	C → T	279	-	-
	A → T	286	-	-
	A → T	311	K → M	104

* Ø – una delección que modifica la lectura

Tabla 5. Polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) y sustituciones de aminoácidos en las proteínas que codifican las secuencias con homologías del 93 % - 94%.

MUESTRA	NUCLEÓTIDO		PROTEÍNA	
	Cambio	Posición	Cambio	Posición
92 H	G → T	215	G → V	72
	GC → TA	247-248	A → Y	83
	CC → GT	251-252	T → S	84
	C → G	260	S → C	87
	C → T	264	-	-
	CC → GT	278-279	S → C	93
	G → A	280	V → I	94
	AA → GT	283-284	K → V	95
	A → T	286	T → S	96
	TC → GT	292-293	S → V	98
	A → T	295	T → S	99
	A → C	299	E → A	100
	A → G	301	T → A	101
93 H	G → T	215, 247	-	-
	CCG → GTA	278-280	-	-
	A → T	284, 286	-	-
	C → T	293	-	-
	A → T	295	-	-
	A → C	299	-	-
	C → G	302	-	-
	TC → AG	306-307	-	-
	AGG → TAT	311-313	-	-
	A → T	316	-	-

MUESTRA	NUCLEÓTIDO		PROTEÍNA	
	Cambio	Posición	Cambio	Posición
192 G	A → C	93	R → S	31
	GAA → CTT	94-96	E → L	32
	GC → TA	247-248	A → Y	83
	CC → GT	251-252	T → S	84
	C → G	260	S → C	87
	C → T	264	-	-
	CC → GT	278-279	S → C	93
	G → A	280	V → I	94
	A → T	286	T → S	96
	C → T	293	S → F	98
	A → T	295	T → S	99
	A → G	301	T → A	101
	T → A	306	-	-
	C → G	307	P → A	103
	AG → TA	311-312	K → I	104

Destaca la aparición de algunas mutaciones de forma repetida en aislamientos tanto en Zaragoza como en León o Granada:

- 247: G→T se repite en 6 aislamientos tanto en muestras de Zaragoza, como en León o Granada.
- 248: C→T (en 2 ocasiones); C→A (en 2 ocasiones)
- 279: C→T (5 aislamientos)
- 286: A→T (5 aislamientos) – aparece tanto en muestras de Zaragoza como de León o Granada
- 311: A→T (5 aislamientos); A→G (1 aislamiento).

Las secuencias de nucleótidos que no se han podido comparar con el resto por haber obtenido un fragmento muy corto son:

- 80L, 29L y 24L: solamente se comparó un fragmento de 191 pb que todas estas secuencias tenían en común, con el mismo obtenido para muestra 9H, las homologías alcanzaron el 95% (80L), 99% (29L) y 100% (24L).
- 55L, 69L, 70L, 71L, 72L, 73L, 56L, 58L y 59L: la comparación se llevó a cabo utilizando un fragmento común de 112 pb, obteniendo homologías del 100% (55L, 69L, 70L, 71L, 72L, 73L), 99% (56L) y 86% (58L y 59L).

Cuando se comparó un fragmento de 95 pb común a todas las secuencias, las homologías que se obtienen para todas ellas oscilan entre el 96-100%. Destacar que el fragmento de 95 pb de la secuencia correspondiente a la muestra 29L presentó con las demás una homología de tan solo el 57 %. Por otra parte, sesenta y dos de las 66 secuencias analizadas presentaron una homología del 100% (36 de Zaragoza y 26 de León). Las secuencias correspondientes a las otras 4 muestras, presentaron homología entre 96% y 99% y respecto a su origen fueron: una muestra de Granada (96%), 1 muestra de Zaragoza (5H) y 2 muestras de León (59L y 135L) con 99%.

IbA12G3R2

Los tres aislamientos de *Cryptosporidium* subtipo IbA12G3R2 procedentes de León, dieron lugar a una secuencia de 617 pb del fragmento del gen *gp60* analizado, con una homología de 99%.

En la muestra 19L se apreciaron las siguientes SNPs: de G a T en la posición 34, de A a T en la posición 94 y de A a C en la posición 134, que implicaron a su vez los siguientes cambios en la proteína: de K a N en la posición 11, de Q a H en la posición 31 y de T a P en la posición 45. En la muestra 25L hay una SNP en la posición 521 de A a C que implica el cambio en la proteína en la posición 174, de T a P (Figuras 36 y 37).

```

      10      20      30      40      50
26L  ....|....|....|....|....|....|....|....|
19L  GAAGGCAAGAGAAGCAGATGGCGGAGAAGAAAAGAAACAATGAAGAAAGCC
25L  .....T.....

      60      70      80      90     100
26L  AAAC TCCCGCTAGTCCTGGAAGTGGTGGGGTGAGTGAAGGACAAGATACT
19L  .....T.....
25L  .....

     110     120     130     140     150
26L  CAAGGTGGCTCCAAGGAGACGCTGAGGAAGGCACTGAAGACAATGAACA
19L  .....C.....
25L  .....

     160     170     180     190     200
26L  AGCCGATGAGAGTGCTACCCAACCTTCTACCCAGGTCAAGGCTCCGTTA
19L  .....
25L  .....

     210     220     230     240     250
26L  AAACCGAATCCACAGAACTACTCCAAAGGAGAAGTGCGGTACTTCATTT
19L  .....
25L  .....

     260     270     280     290     300
26L  GTTATGTGGTTCGGACAGGGTGTTCAGTCGCAACTTTGAAGTGCGGTGA
19L  .....
25L  .....

     310     320     330     340     350
26L  CTATAC TATGGTCTATGCACCAGAAAAGGACAAAACAGATCCCGCACCAA
19L  .....
25L  .....

     360     370     380     390     400
26L  GATATATCTCTGGTGAAGTTACAACCGTAACCTTTGATAAACCAAGAGAGT
19L  .....
25L  .....

     410     420     430     440     450
26L  ACAGTTACAATCAAGGTTAATAATGTAGAGTTCGGCACTCTCTCTACTAG
19L  .....
25L  .....

     460     470     480     490     500
26L  CTC AAGTAAACCAACTGAAAATAAAGGTGAGTCTAGCGATCAGGTTGGGT
19L  .....
25L  .....

```

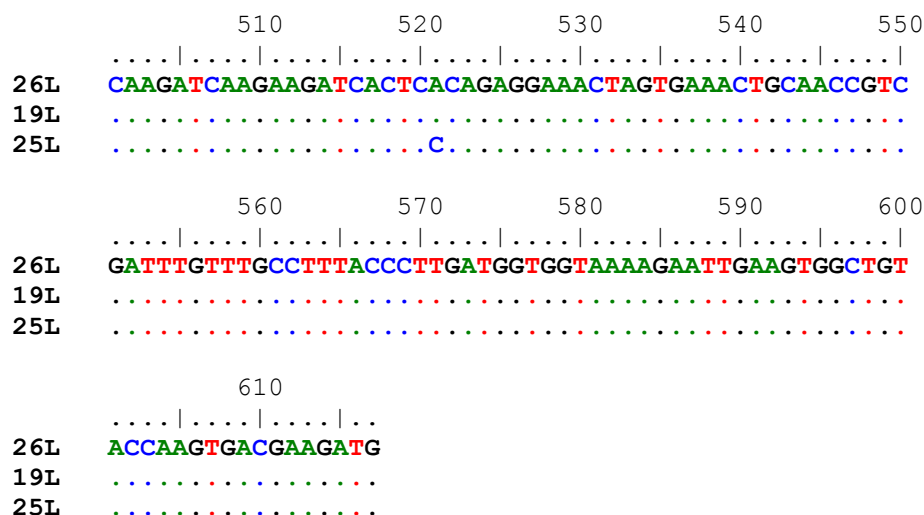


Figura 36. Sustituciones de nucleótidos en las secuencias obtenidas para *Cryptosporidium* subtipo IbA12G3R2.

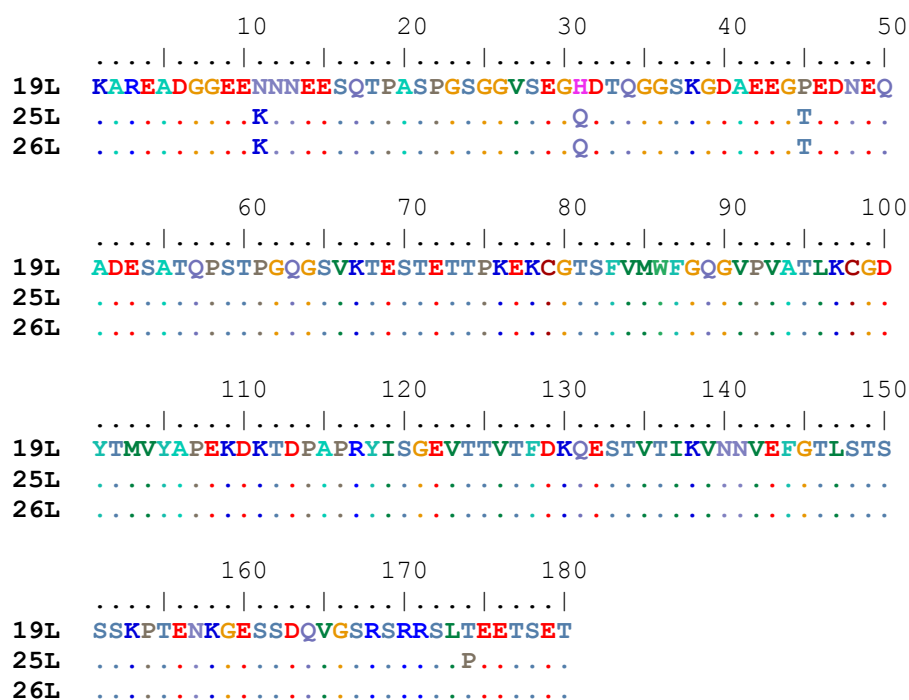


Figura 37. Sustituciones en las proteínas en las secuencias obtenidas para *Cryptosporidium* subtipo IbA12G3R2.

Subtipos *Cryptosporidium parvum*

IIaA15G2R1

Para poder comparar las seis secuencias que correspondieron a este subtipo de *C. parvum*, se analizó un fragmento común de 309 pb, obteniendo una homología del 99%.

La secuencia 3L presenta sustitución en región de variable de repeticiones en tándem de los trinucleótidos que codifican serina (TCA/TCG/TCT), de T a A en la posición 31, lo que implica una sustitución en la proteína de los aminoácidos que se encuentran en posición 11, de S a T.

Las otras sustituciones están fuera de la región de repeticiones. En la muestra 124L hay sustitución en la posición 79 de A a G lo que implica el cambio en la proteína en el aminoácido en posición 27, de T a A: en la muestra 130L hay dos sustituciones de G a T en las posiciones 247 y de A a T en la 279 de la secuencia nucleotídica, lo que implicó cambios en la proteína en los aminoácidos que se encuentran en posiciones 83 y 93, de A a S y de K a N respectivamente. En la secuencia de nucleótidos correspondiente a la muestra 172L, se ha producido una inserción de adenina en la posición 305, lo que implica el cambio en los aminoácidos que ocupan en la proteína las posiciones 102 y 103, de MW a NV (Figuras 38 y 39).

Las secuencias revisadas correspondían a *Cryptosporidium parvum* presente en 5 muestras de León y una de Zaragoza.

	10	20	30	40	50
172L	AAGGATGTTCTGTTGAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATC				
179H				
3LA.....				
124L				
65L				
130L				
	60	70	80	90	100
172L	ATCATCATCATCATCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGG				
179H				
3L				
124LG.....				
65L				
130L				

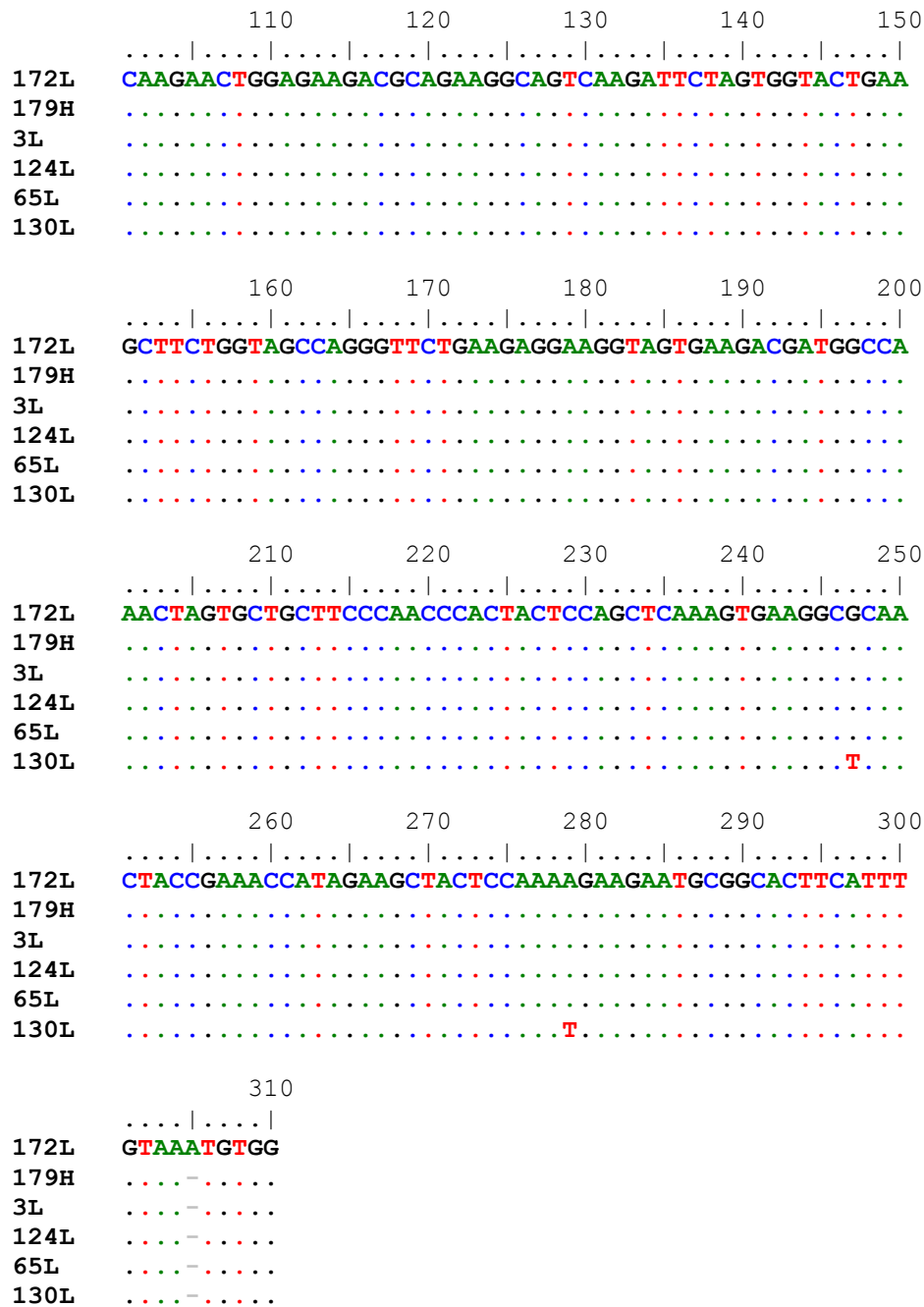


Figura 38. SNPs halladas en las secuencias de nucleótidos correspondientes a *C. parvum* subtipo IIaA15G2R1.

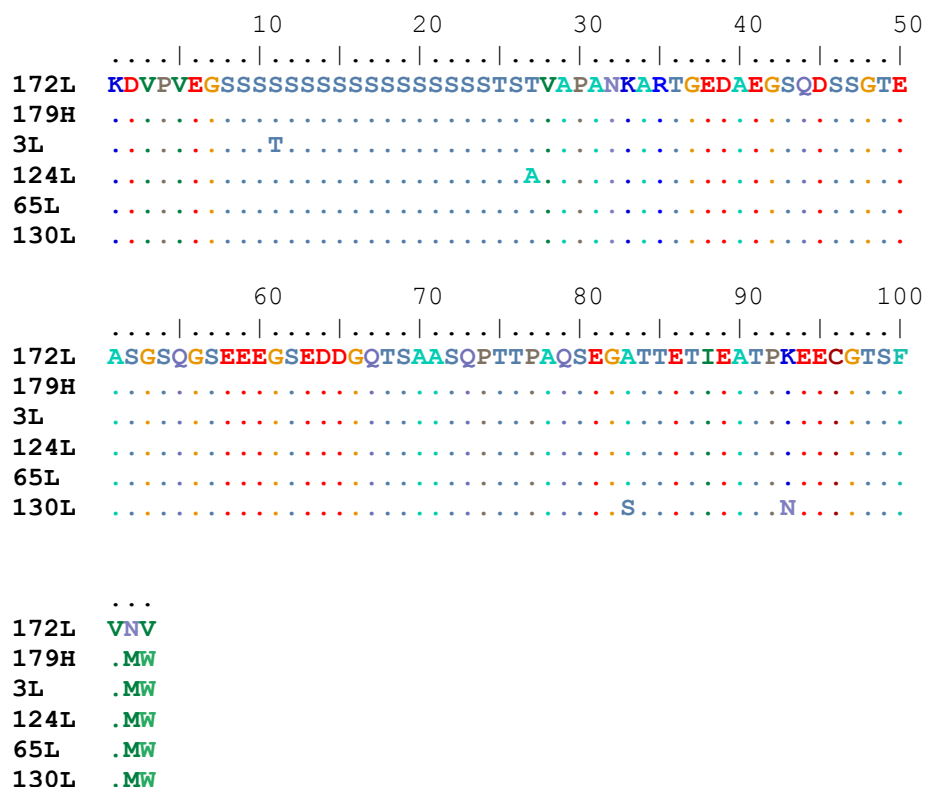


Figura 39. Sustituciones encontradas en la secuencia de proteínas de *C. parvum* subtipo IIaA15G2R1.

IIaA17G2R1

Todas las secuencias del fragmento del gen *gp60* de *C. parvum* subtipo IIaA17G2R1 pertenecen a muestras de León.

Comparando un fragmento del producto de amplificación del gen *gp60* de 744 pb de *C. parvum* contenido en las muestras 53L, 64L y 32L se observaron homologías del 98% - 99% entre ellas.

En la muestra 53L, las sustituciones de los nucleótidos en posiciones 298 (de A a C) y 436 (de A a T) implicaron cambios en los aminoácidos que en la proteína se encuentran en posiciones 100 (de T a P) y 146 (de T a S). Otros cambios de nucleótidos encontrados en esta muestra (de A a G en posición 309 y de T a G en posiciones 327 y

354) no implicaron sustituciones de aminoácidos en la proteína, por lo que se consideran mutaciones silenciosas.

En la muestra 32L el cambio del nucleótido en la posición 112, de A a C implicó un cambio del aminoácido que ocupa en la proteína codificada la posición 38 (T→P), el cambio en la secuencia de nucleótidos de C a A en posición 392 supone la sustitución de T a K en la proteína, en posición 131. El cambio del nucleótido T a A en posición 420 no produjo cambios en la proteína y el cambio en posición 443 de la secuencia nucleotídica de A a T supuso un cambio en proteína en posición 148, de E a V. Los cambios de nucleótidos A a G en posiciones 448 y 452, de A a T en posiciones 454 y 455 y de A a C en posición 457 producen cambios en la proteína de SDNT a GGFP en posiciones de 150 a 153. Finalmente la sustitución de A por C en posición 490 implicó el cambio en proteína de S a R en posición 164.

La comparación entre las 5 secuencias se realizó sobre un fragmento de 182 pb, que mostró homologías entre el 98% y 100%. Las muestras idénticas fueron 53L, 64L y 54L.

En ninguna de las secuencias se encontraron sustituciones en la región de repetición de codones.

Las sustituciones fuera de la región de repeticiones fueron las siguientes:

En la muestra 57L hay una sustitución de A a C en la posición 45 que no implica ninguna modificación en la proteína y dos sustituciones de A a G en las posiciones 145 y 170 de la secuencia de nucleótidos, que implican en la proteína el cambio de S a G en la posición 49 y de Q a R en la posición 57. En la muestra 32L hay una sustitución en la posición 112 de A a C que produce la sustitución de T a P en la posición 38 de la proteína correspondiente (Figura 40).

	10	20	30	40	50
53L				
	AAGGATGTTTCTGTTGAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATC				
	LysAspValProValGluGlySerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSer				
64L				
	LysAspValProValGluGlySerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSer				
54L				
	LysAspValProValGluGlySerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSer				
57L				
	LysAspValProValGluGlySerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSer				
32L				
	LysAspValProValGluGlySerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSer				
	60	70	80	90	100
53L				
	ATCATCATCATCATCATCATCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAA				
	SerSerSerSerSerSerSerSerSerThrSerThrValAlaProAla				
64L				
	SerSerSerSerSerSerSerSerSerThrSerThrValAlaProAla				
54L				
	SerSerSerSerSerSerSerSerSerThrSerThrValAlaProAla				
57L				
	SerSerSerSerSerSerSerSerSerThrSerThrValAlaProAla				
32L				
	SerSerSerSerSerSerSerSerSerThrSerThrValAlaProAla				
	110	120	130	140	150
53L				
	ATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCGAGAAGGCAGTCAAGATTCTAGTGGT				
	AsnLysAlaArgThrGlyGluAspAlaGluGlySerGlnAspSerSerGly				
64L				
	AsnLysAlaArgThrGlyGluAspAlaGluGlySerGlnAspSerSerGly				
54L				
	AsnLysAlaArgThrGlyGluAspAlaGluGlySerGlnAspSerSerGly				
57L				
	AsnLysAlaArgThrGlyGluAspAlaGluGlySerGlnAspSerGlyGly				
32L				
	AsnLysAlaArgProGlyGluAspAlaGluGlySerGlnAspSerSerGly				
	160	170	180		
53L				
	ACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGA				
	ThrGluAlaSerGlySerGlnGlySerGlu				
64L				
	ThrGluAlaSerGlySerGlnGlySerGlu				
54L				
	ThrGluAlaSerGlySerGlnGlySerGlu				
57L				
	ThrGluAlaSerGlySerArgGlySerGlu				
32L				
	ThrGluAlaSerGlySerGlnGlySerGlu				

Figura 40. Comparación de las secuencias de proteínas de *C. parvum* subtipo IIaA17G2R1.

IIdA19G1

Los dos aislamientos de *C. parvum* subtipo IIdA19G1 presentaron una homología del 100% en el fragmento de 296 pb como se muestra en la figura 41. Las dos muestras procedían de pacientes de León (132L y 185L).

```

      10      20      30      40      50
132L  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      TCAGCCCCAGCCGTTCCACTCAGAGGCACTTTAAAGGATGTTTCTGTTGA
      SerAlaProAlaValProLeuArgGlyThrLeuLysAspValSerValGlu

      60      70      80      90      100
132L  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      GGGTTCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCGTCAT
      GlySerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSer

      110     120     130     140     150
132L  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      CATCATCATCATCAACATCGACTGTAGCACCAACTCCAAAGAAAGAAAGA
      SerSerSerSerSerThrSerThrValAlaProThrProLysLysGluArg

      160     170     180     190     200
132L  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      ACTGGAGAGGAAGTAGGTAATCCAGGTTCTGAAGGTCAGGACGGTAAAGG
      ThrGlyGluGluValGlyAsnProGlySerGluGlyGlnAspGlyLysGly

      210     220     230     240     250
132L  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      AGACACTGAAGAAACAGAAGACAATCAGACCGAGAGTACTGTTTCTCAAA
      AspThrGluGluThrGluAspAsnGlnThrGluSerThrValSerGln

      260     270     280     290
132L  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      ATACTCCAGCTCAAACCTGAAGGCACAAC TACCGAAACCACAGAAG
      AsnThrProAlaGlnThrGluGlyThrThrThrGluThrThrGlu

```

Figura 41. Secuencia obtenida del fragmento amplificado del gen *gp60* para *C. parvum* subtipo IIdA19G1.

IIaA13G2R1

Las dos secuencias caracterizadas, pertenecientes al subtipo IIaA13G2R1 de *C. parvum* presentan una homología de 99%, cuando se compara un fragmento de 320 pb de longitud. Una muestra fue tomada en Zaragoza y la otra de León.

Estas secuencias presentan dos sustituciones en la región de repeticiones que codifican para serina en la muestra 170H en posición 51 de A a G y en la posición 63 de G a A lo que no implicó sustitución de aminoácidos en la proteína (Figura 42).

	10	20	30	40	50	
87L					
	CCAGCCGTTCCACTCAGAGGAACTTTAAAGGATGTTCCCTGTTGAGGGCTC					
	ProAlaValProLeuArgGlyThrLeuLysAspValProValGluGlySer					
170H					
	ProAlaValProLeuArgGlyThrLeuLysAspValProValGluGlySer					
	60	70	80	90	100	
87L					
	ATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCAACATCAA					
	SerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerThrSer					
170H	G.....					
	SerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerThrSer					
	110	120	130	140	150	
87L					
	CCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGT					
	ThrValAlaProAlaAsnLysAlaArgThrGlyGluAspAlaGluGlySer					
170H					
	ThrValAlaProAlaAsnLysAlaArgThrGlyGluAspAlaGluGlySer					
	160	170	180	190	200	
87L					
	CAAGATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGA					
	GlnAspSerSerGlyThrGluAlaSerGlySerGlnGlySerGluGluGlu					
170H					
	GlnAspSerSerGlyThrGluAlaSerGlySerGlnGlySerGluGluGlu					
	210	220	230	240	250	
87L					
	AGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCTGCTTCCCAACCCACTACTC					
	GlySerGluAspAspGlyGlnThrSerAlaAlaSerGlnProThrThr					
170H					
	GlySerGluAspAspGlyGlnThrSerAlaAlaSerGlnProThrThr					
	260	270	280	290	300	
87L					
	CAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAA					
	ProAlaGlnSerGluGlyAlaThrThrGluThrIleGluAlaThrProLys					
170H					
	ProAlaGlnSerGluGlyAlaThrThrGluThrIleGluAlaThrProLys					
	310	320				
87L					
	GAAGAATGCGGCACCTTCATT					
	GluGluCysGlyThrSer					
170H					
	GluGluCysGlyThrSer					

Figura 42. Comparación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos pertenecientes al subtipo IIaA13G2R1 de *C. parvum*, obtenidas de una muestra de León (87L) y una de Zaragoza (170H).

Cryptosporidium ubiquitum

Las secuencias de *C. ubiquitum* obtenidas por amplificación del ADN de una muestra de Zaragoza y otra de León, amplificado con el gen *SSU*, tienen una homología 100% cuando se compara un fragmento de 117 pb (Figura 43). La secuencia de la muestra de León y de Zaragoza tienen una homología 100% en un fragmento de 117pb con la secuencia registrada en la base de datos GenBank con número KP899827 (Blanco et al., 2015). El fragmento amplificado con el ADN procedente de la muestra de León tiene 99.5% de homología con esta misma secuencia pero en un fragmento de 440 pb (Figura 44).

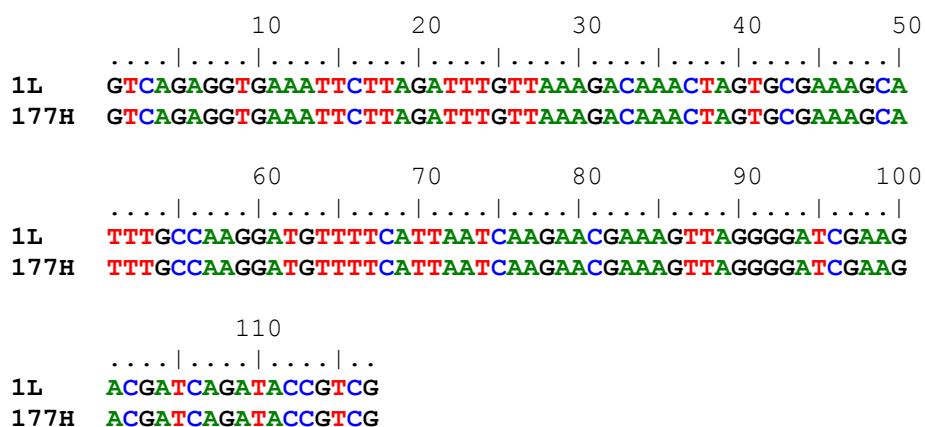


Figura 43. Las secuencias de nucleótidos pertenecientes a *C. ubiquitum* contenido en una muestra de Zaragoza y otra de León.

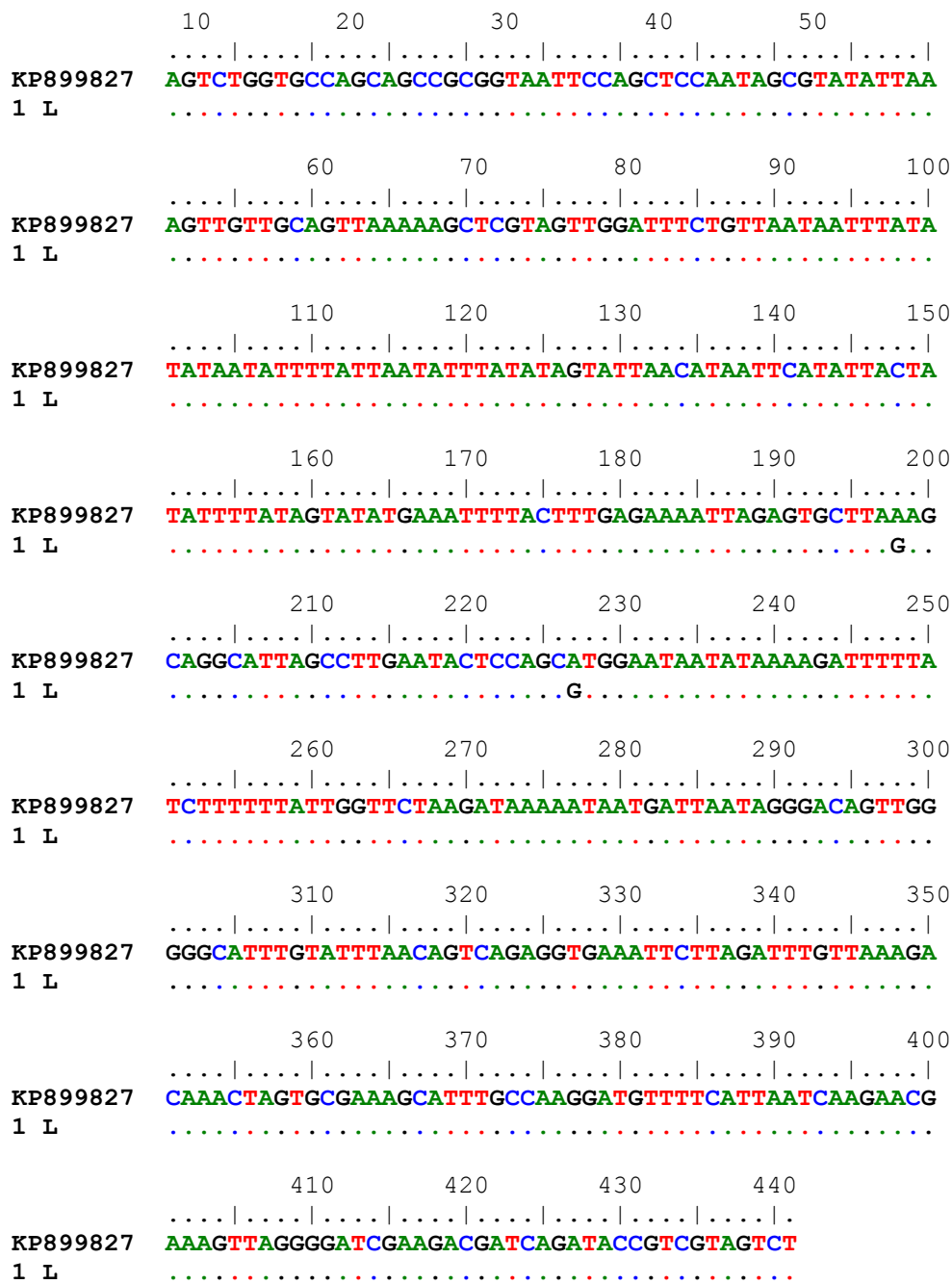
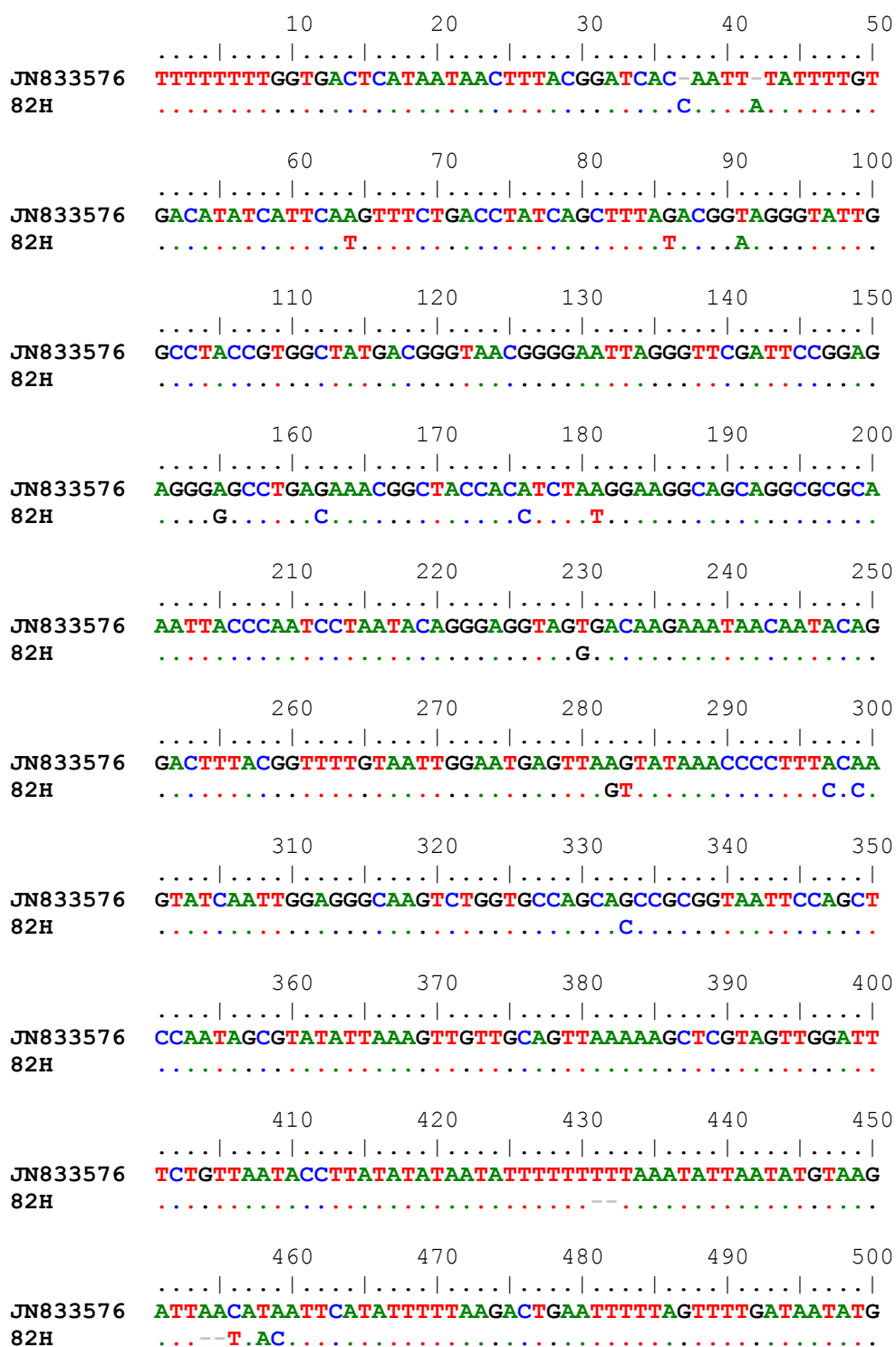


Figura 44. Comparación de la secuencias de nucleótidos obtenida para el fragmento del gen *SSU*, perteneciente a la especie de *C. ubiquitum* y obtenida de una muestra de León, con la secuencia registrada en GenBank (KP899827).

Cryptosporidium felis

La secuencia obtenida para el fragmento amplificado de *C. felis* con el gen *SSU* tiene una homología de 96,7% con la secuencia registrada en base de datos con número JN833576 (Figura 45).



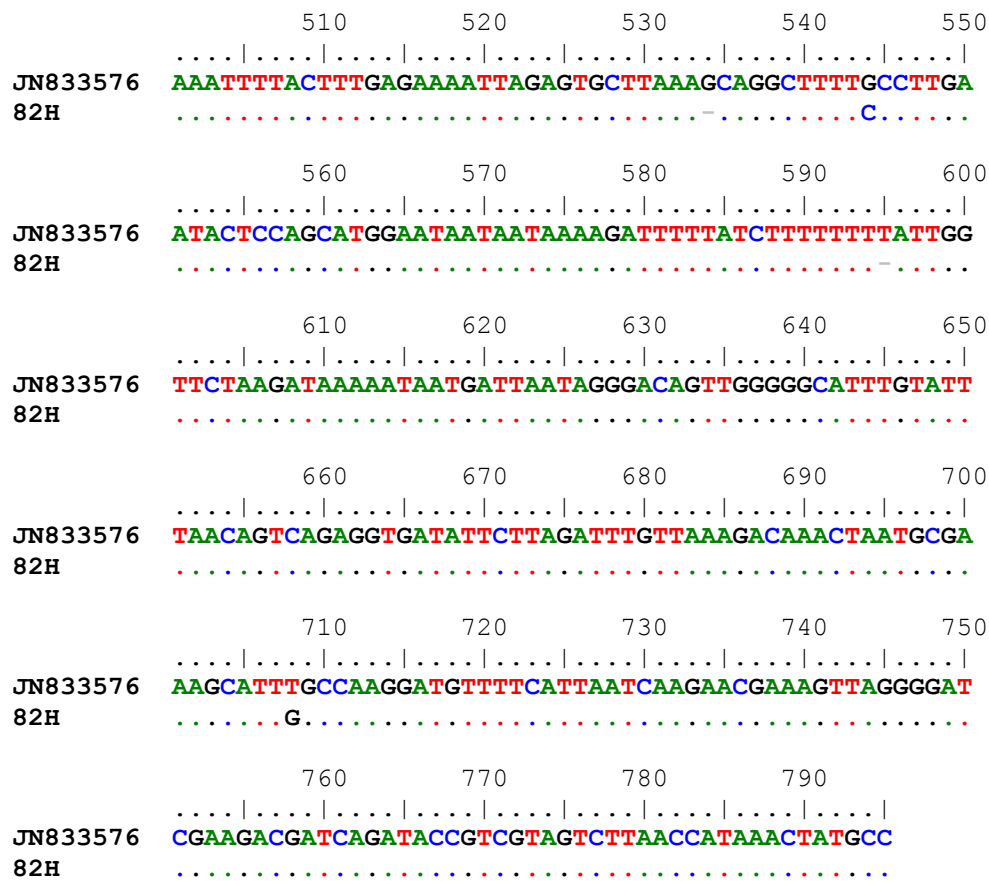
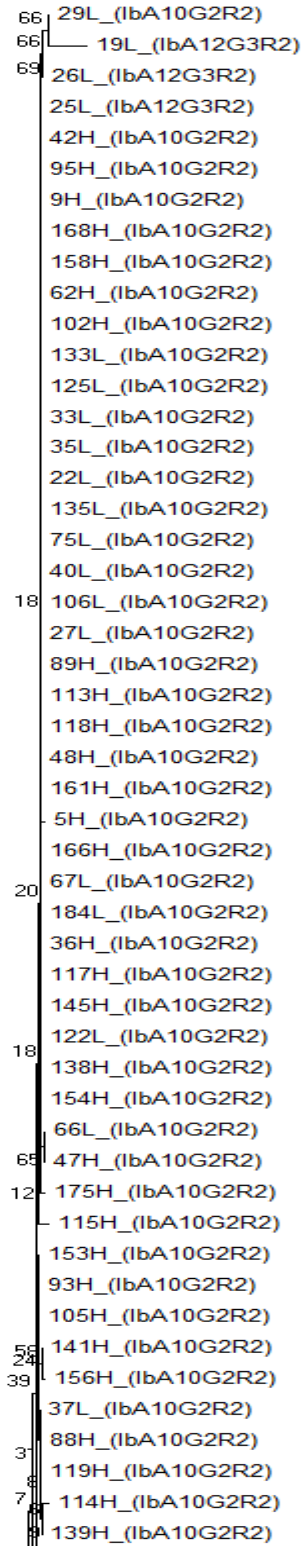


Figura 45. Comparación de las secuencias de nucleótidos obtenidas para el fragmento del gen *SSU* de *C. felis* caracterizado en este trabajo (muestra 82H) y la registrada en GenBank con número JN833576.

Relación filogenética entre todos los subtipos de *Cryptosporidium* objeto de estudio



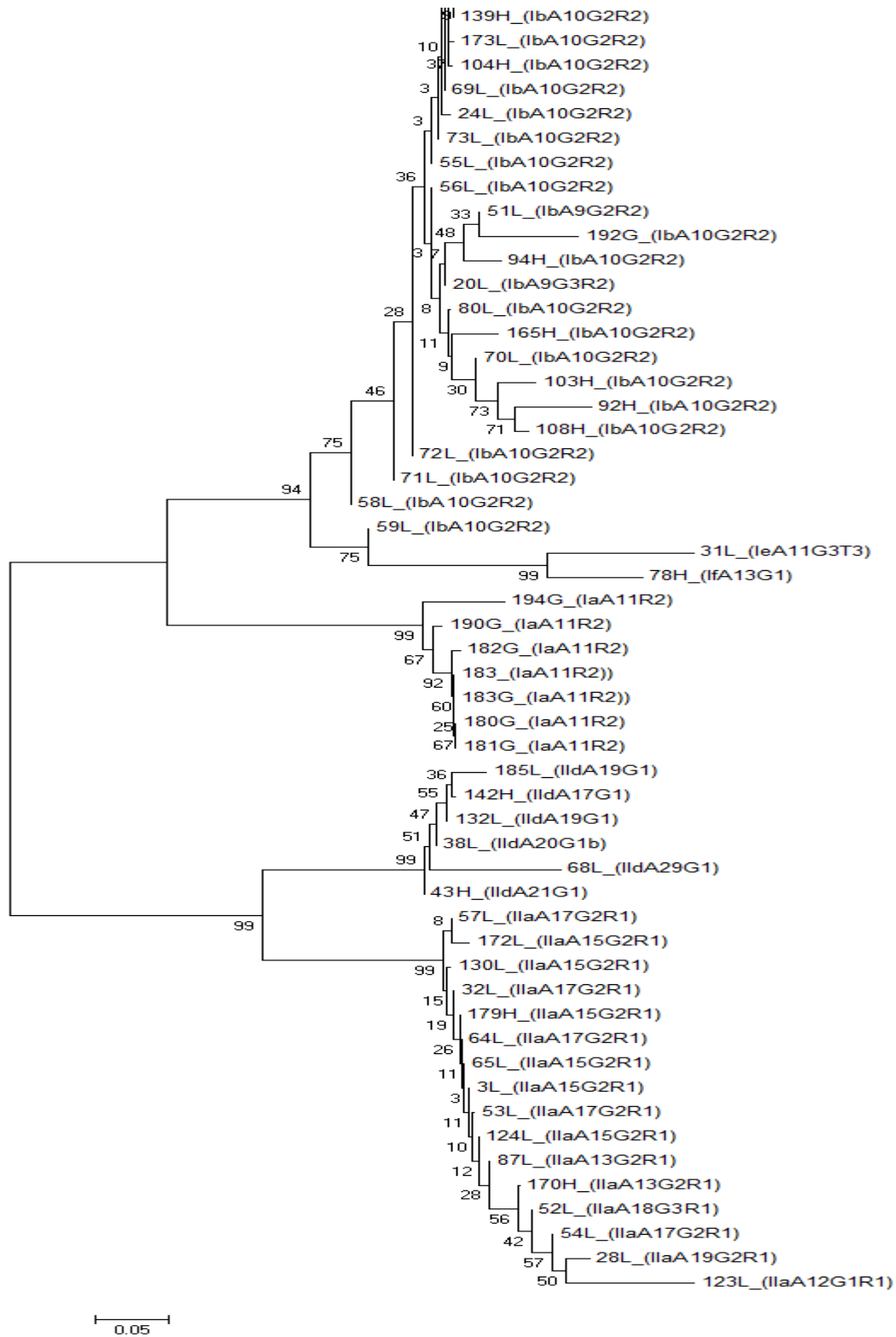


Figura 46. Árbol filogenético de los subtipos de *Cryptosporidium* spp. aislados en presente trabajo.



Figura 47. Árbol filogenético de los subtipos de *Cryptosporidium* spp., objeto de estudio, encontradas en la ciudad de León.

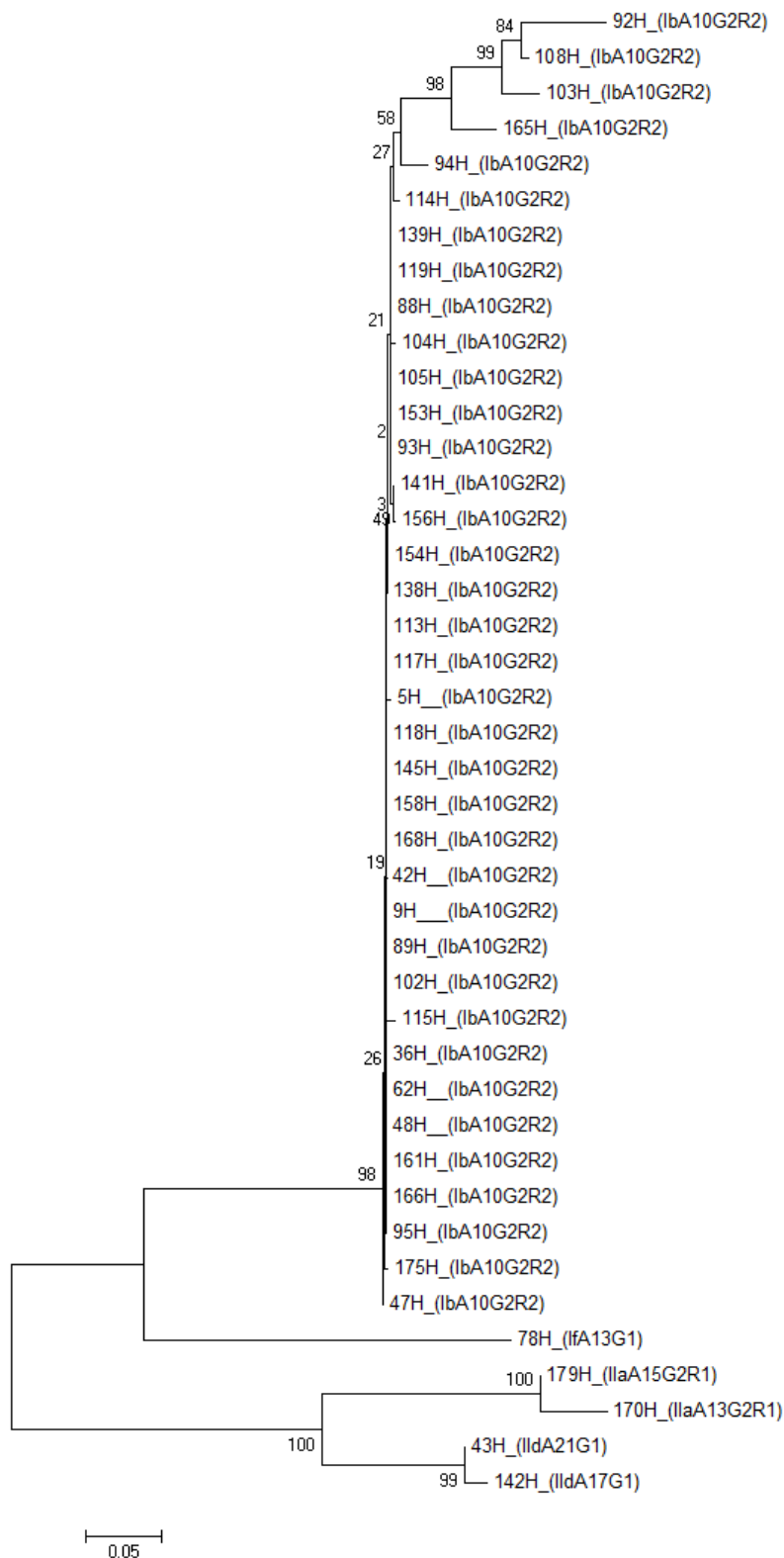


Figura 48. Árbol filogenético de los subtipos de *Cryptosporidium* spp., objeto de estudio, encontradas en la ciudad de Zaragoza.

Comparación de técnicas de diagnóstico: tinción frente a PCR

Todas las muestras objeto de estudio han sido analizadas con las técnicas de tinción Zielh-Neelsen modificada y las técnicas de la PCR, usando la combinación de las técnicas PCR-SSU y PCR-*gp60*. Los resultados muestran que de las 153 muestras que dieron positivas con las técnicas de PCR, 65 (42%) habían dado previamente resultado negativo con microscopía y tinción previa (Figura 49).

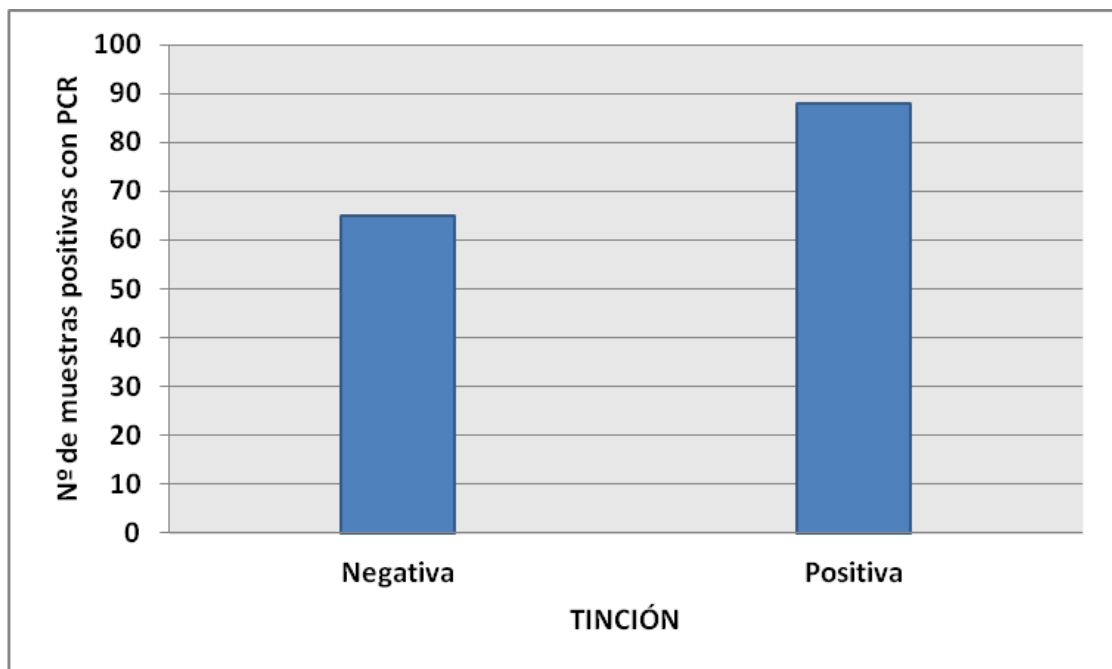


Figura 49

Immunocromatografía de *Giardia duodenalis*

Las muestras positivas para *Cryptosporidium* se estudiaron también por inmunocromatografía con el test inmunocromatográfico "Simple-Crypto-Giardia-Entamoeba" (Operon S.L., Zaragoza, España). Dicho test analiza simultáneamente la presencia de *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica*. De las 61 muestras procedentes del Hospital Clínico de Zaragoza, 16 dieron positivo para *Giardia duodenalis*. En las muestras procedentes de León, 5 de las 80 estudiadas por inmunocromatografía, dieron positivo para *Giardia*.

Esto supone un porcentaje de co-infección del 26% para Zaragoza y del 6,25% para León.

GIARDIA DUODENALIS

Se analizaron 63 muestras procedentes de 26 pacientes, 7 del Hospital Clínico “Lozano Blesa” de Zaragoza y 19 del Complejo Asistencial de León. Todas ellas son muestras de pacientes diagnosticados de giardiosis, de forma que las muestras de cada paciente han sido tomadas de forma consecutiva en días alternos. Once pacientes aportaron tres muestras y 15 dos muestras.

Todos los pacientes se encontraban en el rango de edad comprendido entre 0 y 11 años, excepto 5 de ellos, que tenían edades superiores a los 18 años y 3 que faltaron datos correspondientes. El 61,54% de los pacientes (16/26) fueron varones, el 34,62% (9/26) eran mujeres y para el 3,84% (1/26) restante no se dispuso de los datos correspondientes.

Para todas las muestras se realizó extracción de ADN y posterior PCR para amplificar los correspondientes fragmentos de los genes *tpi* y *β-giardina*. Del primero se obtuvieron 35 secuencias y del segundo 20, que corresponden a 23 y 13 pacientes respectivamente. En total se consiguió secuenciar el fragmento amplificado de ambos genes en 18 muestras, procedentes de 12 pacientes.

Analizando las muestras con el gen *tpi* resultó que 21/26 pacientes tenían infección con *Giardia* genotipo B y 2/26 pacientes con genotipo A.

Analizando las 35 muestras secuenciadas con el gen *tpi* dos secuencias resultaron ser más cortas: la 565 con solo 167 pb y la 167 con 404 pb por lo que no se han podido comparar con las otras secuencias.

Para las 33 secuencias restantes se ha podido comparar un fragmento de 443 pb. Tomando como estándar la secuencia 593 se observa una homología del 100%, es decir identidad, para 7 secuencias (620 y 621; 176, 184, 5 y 5a y la secuencia 12 que corresponden a los pacientes 9, 21 y 23), mientras que otras 21 secuencias presentaron homologías superiores a las 5 secuencias restantes (553, 566, 178 y 179 (paciente 15) y 233) que tienen homología con la secuencia estándar de tan solo un 78%, presentan entre ellas una homología de entre 99,3% a 100%.

12P566tpi	GCC..A....G..A....C.....A..C..G..A..ACAGT...G
15P178tpi	GCC..A....G..A....C.....A..C..G..A..ACAGT...G
15P179tpi	GCC..A....G..A....C.....A..C..G..A..ACAGT...G
19P233tpi	GCC..A....G..A....C.....A..C..G..A..ACAGT...G
19P237tpi
10P581tpi
10P582tpi
10P583tpiC..C.....T...
13P148tpiA..C..C.....
16P171tpi
20P4atpi
23P16tpiT.....
24P25tpiT.....
25P26tpiC..C.....T...
25P26atpiC..C.....
110 120 130 140 150	
6P593tpi
6P592tpi	AATAGCAGCACAGAACGTGTATCTGGAAGGGAACGGTGCATGGACCGGCG
9P620tpiG.....
9P621tpi
17P176tpi
18P184tpi
21P5tpi
21P5atpi
22P12tpi
1P521tpiG.....
1P525tpi
2P519tpiG.....
2P526tpiG.....
3P551tpiG.....G.....
5P563tpi
7P587tpiC.....G.....
7P589tpiG.....T.....
8P553tpi	G.....G.....T.....C..A..G.....G..G.....T.....
12P566tpi	G.....G.....T.....C..A..G.....G..G.....T.....
15P178tpi	G.....G.....T.....C..A..G.....G..G.....T.....
15P179tpi	G.....G.....T.....C..A..G.....G..G.....T.....
19P233tpi	G.....G.....T.....C..A..G.....G..G.....T.....
19P237tpi
10P581tpiG.....
10P582tpiG.....
10P583tpiT.....G.....G.....
13P148tpiG.....
16P171tpi
20P4atpi
23P16tpi
24P25tpi
25P26tpiG.....
25P26atpiG.....
160 170 180 190 200	
6P593tpi
6P592tpi	AGACAAGCGTCGAGATGCTGCTGGACATGGGGCTGAGCCATGTAATAATA
9P620tpi
9P621tpi
17P176tpi
18P184tpi

RESULTADOS

21P5tpi
21P5atpi
22P12tpi
1P521tpi
1P525tpiA.....
2P519tpiG.
2P526tpiT.....G.
3P551tpi
5P563tpi
7P587tpi
7P589tpi
8P553tpiT..T.....T.A.....TT...AG....G...G..
12P566tpiT..T.....T.A.....TT...AG....G...G..
15P178tpiT..T.....T.A.....TT...AG....G...G..
15P179tpiT..T.....T.A.....TT...AG....G...G..
19P233tpiT..T.....T.A.....TT...AG....G...G..
19P237tpi
10P581tpi
10P582tpi
10P583tpi
13P148tpiG.....T.....
16P171tpi
20P4atpi
23P16tpiA.....
24P25tpiT.....
25P26tpi
25P26atpiG.....
	210 220 230 240 250

6P593tpi	GGACACTCTGAAAGACGTAGAATCATGGGCGAGACCAATGAGCAGAGTGC
6P592tpi
9P620tpi
9P621tpi
17P176tpi
18P184tpi
21P5tpi
21P5atpi
22P12tpi
1P521tpi
1P525tpi
2P519tpiG.
2P526tpiG.
3P551tpi
5P563tpi
7P587tpi
7P589tpi
8P553tpi	..G.....C.....G.....G.C.....A..C..
12P566tpi	..G.....C.....G.....G.C.....A..C..
15P178tpi	..G.....C.....G.....G.C.....A..C..
15P179tpi	..G.....C.....G.....G.C.....A..C..
19P233tpi	..G.....C.....G.....G.C.....A..C..
19P237tpi	..G.....
10P581tpi
10P582tpi
10P583tpi
13P148tpi
16P171tpi
20P4atpi	..G.C.....
23P16tpi

24P25tpi
25P26tpi
25P26atpi
	260 270 280 290 300

6P593tpi	TAAGAAGGCGAAGCGTGCTCTGGACAAAGGTATGACTGTTATCTTCTGCA
6P592tpi
9P620tpi
9P621tpi
17P176tpi
18P184tpi
21P5tpi
21P5atpi
22P12tpi
1P521tpi
1P525tpi
2P519tpi
2P526tpi
3P551tpi
5P563tpi
7P587tpi
7P589tpi
8P553tpi	C.....T.....C.....A..G..G.....G..C.....T...G
12P566tpi	C.....T.....C.....A..G..G.....G..C.....G
15P178tpi	C.....T.....C.....A..G..G.....G..C.....G
15P179tpi	C.....T.....C.....A..G..G.....G..C.....G
19P233tpi	C.....T.....C.....A..G..G.....G..C.....G
19P237tpi
10P581tpi
10P582tpi
10P583tpi
13P148tpi
16P171tpi
20P4atpi
23P16tpi
24P25tpi
25P26tpi
25P26atpi
	310 320 330 340 350

6P593tpi	CCGGAGAGACCCCTGGATGAACGCAAGGCCAATAACACTATGGAGGTAAAT
6P592tpiG..
9P620tpi
9P621tpi
17P176tpi
18P184tpi
21P5tpi
21P5atpi
22P12tpi
1P521tpiG..
1P525tpiG..
2P519tpiG.....G..
2P526tpiG.....G..
3P551tpiG..
5P563tpiG..
7P587tpiG..
7P589tpiG..
8P553tpi	T.....T.....GT.....CCG...C.....G..C

RESULTADOS

12P566tpi	T.....T.....G.....CCG..C.....G..C
15P178tpi	T.....T.....G.....CCG..C.....G..C
15P179tpi	T.....T.....G.....CCG..C.....G..C
19P233tpi	T.....T.....G.....CCG..C.....G..C
19P237tpi
10P581tpiG..
10P582tpiG..
10P583tpiG..
13P148tpiG..
16P171tpi
20P4atpi
23P16tpiG.....G..
24P25tpiT.....G..
25P26tpiG..
25P26atpiG..
	360 370 380 390 400
6P593tpi
6P592tpi	ATTGCTCAGCTCGAGGCTCTTAAGAAGGAGATTGGAGAATCAAAGAAGTT
9P620tpi
9P621tpi
17P176tpi
18P184tpi
21P5tpi
21P5atpi
22P12tpi
1P521tpi
1P525tpi
2P519tpi
2P526tpi
3P551tpi
5P563tpi
7P587tpiC.....
7P589tpi
8P553tpi	..C..C.....T.....G...GGC.....C.C.....G..C...T.C.
12P566tpi	..C..C.....T.....G...GGC.....C.C.....G..C...T.C.
15P178tpi	..C..C.....T.....G...GGC.....C.C.....G..C...T.C.
15P179tpi	..C..C.....T.....G...GGC.....C.C.....G..C...T.C.
19P233tpi	..C..C.....T.....G...GGC.....C.C.....G..C...T.C.
19P237tpi
10P581tpi
10P582tpi
10P583tpi
13P148tpi
16P171tpi	...T.....
20P4atpi
23P16tpiC.....
24P25tpi
25P26tpiG.....
25P26atpi
	410 420 430 440
6P593tpi
6P592tpi	ATGGGAGAACGTTGTAATTGCCTATGAGCCGGTGTGGTCTATC
9P620tpi
9P621tpi
17P176tpi
18P184tpi

21P5tpi
21P5atpi
22P12tpi
1P521tpiG.....
1P525tpi
2P519tpi
2P526tpi
3P551tpi
5P563tpi
7P587tpiT.....A.....
7P589tpiG.....A.....
8P553tpi	C...A..G.G....C....T..C.....C....C..T
12P566tpi	C...A..G.G....C....T..C.....C....C..T
15P178tpi	C...A..G.G....C....T..C.....C....C..T
15P179tpi	C...A..G.G....C....T..C.....C....C..T
19P233tpi	C...A..G.G....C....T..C.....C....C..T
19P237tpi
10P581tpi
10P582tpi
10P583tpi
13P148tpi
16P171tpi
20P4atpi	.A.....GACG.....
23P16tpi	GA.....
24P25tpiT.....
25P26tpi
25P26atpi

Figura 50. Comparación de las secuencias obtenidas para los amplicones del fragmento del gen *tpi* y SNPs halladas en las secuencias de nucleótidos correspondientes a las del gen de la *tpi*.

En la tabla 6 se pueden observar las sustituciones nucleotídicas puntuales en las secuencias del mismo paciente, los cambios resultantes en la proteína que codifican y otras informaciones adicionales como número de pares de bases de nucleótidos y proteínas e identidad de las muestras.

Tabla 6. Sustituciones nucleotídicas puntuales en las secuencias de la *tpi* del mismo paciente y los cambios resultantes en la proteína que codifican.

PACIENTE Datos (muestras, assemblage, identidad %, pares de bases: N-nucleótidos P-proteína)	MUE STRA Con cambi os	NUCLEOTIDO		PROTEÍNA	
		Cambio	Posición	Cambio	Posición
1P 521, 525 B, B 98,7% N – 491pb P – 163aa	525	C → T	57	H → Y	19
		C → T	131	-	-
		C → T	134	-	-
		G → A	176	-	-
		G → A	229	G → E	76
		G → T	480	G → V	160
2P 519, 526 B, B 99,7% N – 497pb P – 165aa	526	C → T	238	H → Y	80
5P 563, 565 B, B 95% N – 166pb P – 55aa	565	T → C	6	M → T	2
		A → T	8	T → S	3
		A → G	28	-	-
		A → T	32	T → S	11
		T → G	40	D → E	13
		A → G	48	K → R	16
		A → G	124	-	-
		G → A	151	-	-

PACIENTE Datos (muestras, assemblage, identidad %, pares de bases: N-nucleótidos P-proteína)	MUE STRA Con cambi os	NUCLEOTIDO		PROTEÍNA	
		Cambio	Posición	Cambio	Posición
6P 592, 593 B, B 99% N – 492pb P – 163aa	593	G → C Ø → A	8 11	KWH→NAN	1 – 3
		G → A	177	-	-
		G → A	396	-	-
9P 620, 621 B, B 100% N – 520pb P – 173aa	-	-	-	-	-
7P 587, 589 B, B 98% N – 530pb P – 177aa	589	G → A	90	-	-
		C → A	177	-	-
		C → T	213	-	-
		C → A	459	-	-
		A → G	476	N → S	159
		T → A	483	-	-
		A → G	493	K → E	165
		G → A	498	-	-
		Ø → C C → G	518 520	GVVAT ↓ AGGGH	173 - 177
10P 581, 582, 583 B, B, B 581,582	583	T → C	9	Y → H	3
		T → C	83	-	-
		T → C	86	-	-

PACIENTE Datos (muestras, assemblage, identidad %, pares de bases: N-nucleótidos P-proteína)	MUE STRA Con cambi os	NUCLEOTIDO		PROTEÍNA	
		Cambio	Posición	Cambio	Posición
↓ 100% 583→98,6% N → 453pb P → 150aa		C → T	96	-	-
		C → T	123	-	-
		A → G	144	T → A	48
15P 178, 179 A, A 100% N - 469pb, P – 153aa	-	-	-	-	-
21P 5, 5a B, B 100% N – 455pb P – 151aa	-	-	-	-	-
25 P 26, 26a B, B 99,4% N – 516pb P – 171aa	26a	T → C	164	-	-
		C → G	251	L → V	84
		G → T	450	S → I	150

Como caso particular se muestra a continuación la comparación de las secuencias obtenidas a partir de las muestras correspondientes al paciente 19, que presentan un 80% de homología entre ellas y 105 SNP. Así mismo, comentar que ambas pertenecen al assemblage B.

```

          10          20          30          40          50
19P233SUL  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCCCTTCATCGGGGGGTAAC TTCAAGTGAACGGCTCTCTTGACTTTATC
SerLeuHisArgGlyValThrSerSerValThrAlaLeuLeuThrLeuSer
19P237SUL  .....-.....A..C..T..A..G..C.....C..T
SerLeuHisArgGly EndLeuGlnMetGlnTrpIleAlaArgLeuHis

          60          70          80          90         100
19P233SUL  AAGAGCCACGTGGCGGCAATTGCTGCCCATTAAGATTCCTGATTCCGTGGA
ArgAlaThrTrpArgGlnLeuLeuProIleArgPheLeuIleProTrp
19P237SUL  .....A...T.C..C..CT..T.....C..C..G.....
EndGluProArgSerValHisArgLeuLeuEndAspProArgValArgGly

          110         120         130         140         150
19P233SUL  CGTCGTCATTGCCCCCTCCGCCGTACACCTGTCAACAGCCATTGCGGCAA
ThrSerSerLeuProProProProTyrThrCysGlnGlnProLeuArgGln
19P237SUL  ...T..TG....T.....TTT..G.....T..T.....T.....G..
ArgCysCysCysSerLeuLeuCysAlaProPheTyrSerTyrCysGlyGlu

          160         170         180         190         200
19P233SUL  ACACGTCAAAACAGTTGAGGATAGCAGCGCAGAATGTGTACCTAGAGGGG
ThrArgGlnAsnSerEndGlyEndGlnArgArgMetCysThrEndArgGly
19P237SUL  .T..T..G..GTGTC...AA.....A.....C.....T..G..A...
TyrPheGluValSerGluAsnSerSerThrGluArgValSerGlyArg

          210         220         230         240         250
19P233SUL  AACGGGGCGTGGACTGGCGAGACAAGTGTGAGATGCTTCAGGACATGGG
ThrGlyArgGlyLeuAlaArgGlnValLeuArgCysPheArgThrTrp
19P237SUL  .....T..A.....C.....C..C.....G..T.....
GluArgCysMetAspArgArgAspLysArgArgAspAlaAlaGlyHisGly

          260         270         280         290         300
19P233SUL  TTTGAAGCATGTGATAGTAGGGCACTCTGAAAGACGCAGAATCATGGGGG
ValEndSerMetEndEndEndGlyThrLeuLysAspAlaGluSerTrpGly
19P237SUL  GC...GC.....A..A.....T.....C..
AlaGluProCysAsnAsnArgAlaLeuEndLysThrEndAsnHisGlyArg

          310         320         330         340         350
19P233SUL  AGACCGACGAGCAAAGCGCCAAGAAGGCTAAGCGTGCCCTGGAAGGGG
ArgProThrSerLysAlaProArgArgLeuSerValProTrpLysArgGly
19P237SUL  .....A.T.....G..T..T.....G.....T.....C..A..T
AspGlnEndAlaGluCysEndGluGlyGluAlaCysSerGlyGlnArg

          360         370         380         390         400
19P233SUL  ATGACGGTCATCTTCTGCGTCGGAGAGACCTTGGATGAGCGCAAGGCCAA
EndArgSerSerSerAlaSerGluArgProTrpMetSerAlaArgPro
19P237SUL  .....T..T.....AC.....C.....A.....
TyrAspCysTyrLeuLeuHisArgArgAspProGlyEndThrGlnGlyGln

```




**Figura 51. La comparación de las dos secuencias pertenecientes al paciente n° 19.
PCR del gen de la β -giardina.**

Comparando las 20 muestras secuenciadas con el gen de la β -giardina se observa que en el fragmento de 447 pb muestran homología de entre 93,5% – 100%. Tomando como estándar la secuencia 233 observamos que las secuencias 178, 179, 5b, 25, 26a y 27a tienen homología de 100% entre ellas. La muestra 563 presenta homología de 99,3% con la secuencia estándar. El resto de las secuencias presentan homología de entre 93,7% - 94,4% con la secuencia 233. Sin embargo, las 3 secuencias que presentan homología 93,7% con la secuencia estándar, entre ellas presentan homología 100% y son: 4a, 5 y 5a. Las diferencias de nucleótidos entre las secuencias se presentan en la figura 52 a continuación.

RESULTADOS

	10	20	30	40	50
19P233BG	CCGCGT	TCGACG	ACGACG	ACGCGG	TGAAGATGATCAAGGACGCCATCGCAC
1P521BG	T	G
3P551BG	T	G
5P563BG
5P565BG	T	G
9P620BG	T	G
9P621BG	T	G
10P581BG	T	G
10P582BG	T	G
10P583BG	T	G
14P167BG	A	T	G
15P178BG
15P179BG
20P4aBG	T	G
21P5BG	T	G
21P5aBG	T	G
21P5bBG
24P25BG
25P26aBG
26P27aBG
	60	70	80	90	100
19P233BG	ACCTCGACAGGCTCATCCAGACGGAGTCGAGGAAGCGCCAGGCCTCGTTC				
1P521BG	T	A	A
3P551BG	A	A
5P563BG
5P565BG	T	A	A
9P620BG	A
9P621BG	A	a
10P581BG	A	A
10P582BG	A	A
10P583BG	A	A
14P167BG	A
15P178BG
15P179BG
20P4aBG	T	A	A
21P5BG	T	A	A
21P5aBG	T	A	A
21P5bBG
24P25BG
25P26aBG
26P27aBG
	110	120	130	140	150
19P233BG	GAGGACATCCGCGAGGAGGTCAAGAAGTCCGCCGACAACATGTACCTAAC				
1P521BG	A	T	G
3P551BG	A	T	G
5P563BG
5P565BG	A	T	G
9P620BG	A	T	G
9P621BG	A	T	G
10P581BG	A	T	G
10P582BG	A	T	G
10P583BG	A	T	G
14P167BG	A	T	G
15P178BG

RESULTADOS

15P179BG
20P4aBGA.....T.....G..
21P5BGA.....T.....G..
21P5aBGA.....T.....G..
21P5bBG
24P25BG
25P26aBG
26P27aBG
	160 170 180 190 200
19P233BG
1P521BG	GATCAAGGAGGAGATCGACACCATGGCTGCAAAC TTCCGCAAGTCCCTTG
3P551BGC.....T.....C.
5P563BG	A.....
5P565BG	A.....C.....T.....
9P620BGC.....T.....
9P621BGC.....T.....
10P581BGC.....T.....C.
10P582BGC.....T.....
10P583BGC.....T.....
14P167BGC.....T.....
15P178BG
15P179BG
20P4aBGC.....T.....
21P5BGC.....T.....
21P5aBGC.....T.....
21P5bBG
24P25BG
25P26aBG
26P27aBG
	210 220 230 240 250
19P233BG
1P521BG	CGGAGATGGGCGACACACTCAACAACGTTGAGACAAATCTCCAGAACCAG
3P551BG	.T.....G.....C.....G..C.....
5P563BG	.T.....G.....C.....G..C.....
5P565BG	.T.....G.....C.....G..C.....
9P620BG	.T.....G.....C.....G..C.....
9P621BG	.T.....G.....C.....G..C.....
10P581BG	.T.....G.....C.....G..C.....
10P582BG	.T.....G.....C.....G..C.....
10P583BG	.T.....G.....C.....G..C.....
14P167BG	.T.....G.....C.....G..C.....
15P178BG
15P179BG
20P4aBG	.T.....G.....C.....G..C.....
21P5BG	.T.....G.....C.....G..C.....
21P5aBG	.T.....G.....C.....G..C.....
21P5bBG
24P25BG
25P26aBG
26P27aBG
	260 270 280 290 300
19P233BG
1P521BG	ATCGCCATCCATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAA
3P551BGC.....A..C.....
C.....A..C.....

5P563BG
5P565BGC.....A..C.....
9P620BGC.....A..C.....
9P621BGC.....A..C.....
10P581BGC.....A..C.....
10P582BGC.....A..C.....
10P583BGC.....A..C.....
14P167BGC.....A..C.....
15P178BG
15P179BG
20P4aBGC.....A..C..T.....
21P5BGC.....A..C..T.....
21P5aBGC.....A..C..T.....
21P5bBG
24P25BG
25P26aBG
26P27aBG
	310 320 330 340 350
19P233BG
1P521BG	GAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGA
3P551BGC.....A.....C.....C..G.....
5P563BGT.....C.....
5P565BGC.....A.....C.....C..G.....
9P620BGC.....A.....C.....C..G..T.....
9P621BGC.....A.....C.....C..G.....
10P581BGC.....A.....C.....C..G.....
10P582BGC.....A.....C.....C..G.....
10P583BGC.....A.....C.....C..G.....
14P167BGC.....A.....C.....C..G.....
15P178BG
15P179BG
20P4aBGC.....A.....C.....C..G.....
21P5BGC.....A.....C.....C..G.....
21P5aBGC.....A.....C.....C..G.....
21P5bBG
24P25BG
25P26aBG
26P27aBG
	360 370 380 390 400
19P233BG
1P521BG	AGAAGATGTACGACCAGCTCAACGAGAAAGGTCGCAGAGGGCTTCGCCCCG
3P551BGT.....A.....
5P563BG
5P565BGT.....A.....
9P620BGT.....A.....
9P621BGT.....A.....
10P581BGT.....A.....
10P582BGT.....A.....
10P583BGT.....A.....
14P167BGT.....A.....
15P178BG
15P179BG
20P4aBGT.....A.....
21P5BGT.....A.....
21P5aBGT.....A.....
21P5bBG

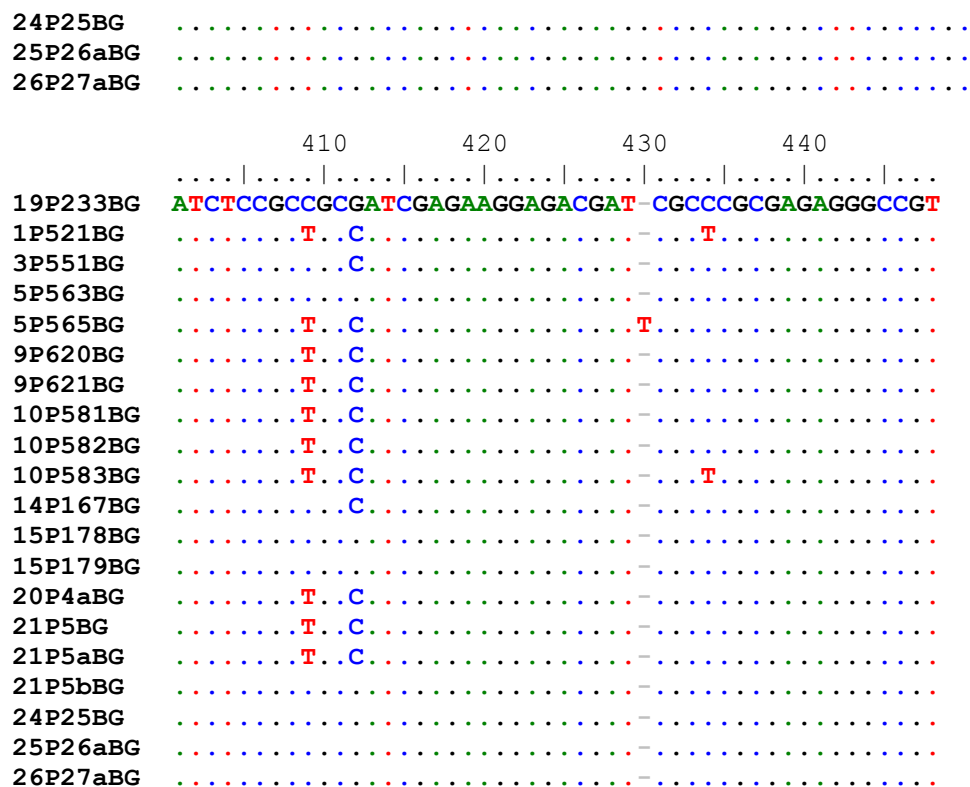


Figura 52. Comparación de las secuencias obtenidas para los amplicones del fragmento del gen β -giardina y SNPs halladas en las secuencias de nucleótidos correspondientes a las muestras del gen de la β -giardina.

En la tabla 7 se pueden observar las sustituciones nucleotídicas puntuales en las secuencias del mismo paciente, los cambios resultantes en la proteína que codifican y otras informaciones adicionales como número de pares de bases de nucleótidos y proteínas e identidad de las muestras.

Tabla 7. SNP (sustituciones nucleotídicas puntuales) en las secuencias de *Giardia duodenalis* de la β -giardina del mismo paciente y los cambios resultantes en la proteína que codifican.

PACIENTE Datos (muestras, assemblage identidad %, pares de bases: n-nucleótidos p-proteína)	MUE STRA Con cambi os	NUCLEOTIDO		PROTEINA	
		Cambio	Posición	Cambio	Posición
5P BG 563, 565 A, B 92,9% N – 480pb P – 159aa	565	C → T	24	-	-
		A → G	51	-	-
		C → T	57	-	-
		G → A	63, 75, 120	-	-
		C → T	132	-	-
		A → G	150	-	-
		T → C	180	-	-
		C → T	198	-	-
		G → T	204	-	-
		A → G	219	-	-
		T → C	231, 240, 264	-	-
		A → G	237	-	-
		G → A	279	-	-
		T → C	282, 307	-	-
		G → A	324	-	-
		T → C	330	-	-
		A → C	346	-	-
		A → G	348	-	-
		C → T	363	-	-
		G → A	381	-	-
		C → T	411	-	-
		G → C	414	-	-

PACIENTE Datos (muestras, assemblage identidad %, pares de bases: n-nucleótidos p-proteína)	MUE STRA Con cambi os	NUCLEOTIDO		PROTEINA	
		Cambio	Posición	Cambio	Posición
		Ø → T A → C G → A T → C T → C A → G G → C	432 451 452 454 457 469 472	ARERAVGA ATTEALT ↓ RPREGRQR RHDRGPH	145 - 159
21P BG 5, 5a B, B ↓ 100% 5b → 92,9% A N – 471 pb P – 157 aa	5b	T → C	24, 57		
		G → A	51, 150		
		A → G	63, 65, 120		
		T → C	132		
		C → T	180		
		T → C	198		
		T → G	204		
		G → A	219		
		C → T	231		
		G → A	237		
		C → T	240, 264		
		A → G	279		
		C → T	282		
		T → C	285		
		C → T	315		
		A → G	325		
		C → T	330		
		C → A	345		
		G → A	348		
		T → C	363		
		A → G	381		

PACIENTE Datos (muestras, assemblage identidad %, pares de bases: n-nucleótidos p-proteína)	MUE STRA Con cambi os	NUCLEOTIDO		PROTEINA	
		Cambio	Posición	Cambio	Posición
		T → C	411		
		C → G	414		
		C → T	450, 453, 456		
		G → A	468		
		C → G	471		
9P BG 620, 621 B, B 99,7% N – 471 pb P – 157 aa	621	T → G	350	M → R	117
10P BG 581 B 582 - 99,7% B 583 – 99,5% B N – 471 pb P – 157 aa	581	T → C	201	-	-
	583	C → T	435	-	-
15P BG 178, 179 A, A 99,5% N – 449 pb P – 159 aa	178	T → Ø Ø → C	450 474	SAATTEAL ↓ VLPRQKRS	151 - 158

Resumen de los pacientes

En total se analizaron 26 pacientes con más de una muestra. Los resultados fueron las siguientes:

- Con alguna muestra negativa *tpi*: 20 pacientes
- Con alguna muestra negativa *β-giardina*: 23 pacientes
- Con alguna muestra negativa por los dos métodos: 19 pacientes

Estudio de las secuencias

Aquellos casos en que se obtuvo más de una secuencia para cada paciente, se procedió a comparar las homologías y las SNPs identificadas para muestras del mismo y de diferentes pacientes, como se muestra a continuación.

➤ *tpi*

Tabla 8. Las assemblages obtenidos con el gen de la *tpi* con la homología de las secuencias y los SNPs.

Secuencias		Paciente	Homología	SNPs	Nucleótidos
<i>t p i</i>	B	1P	98,7%	6 SNPs	491 pb
		2P	99,7%	1 SNPs	497 pb
		*5P	95%	8 SNPs	166 pb
		6P	99%	4 SNPs	492 pb
		9P	100%	0 SNPs	520 pb
		7P	98%	10 SNPs	530 pb
		10P	100% (2)	0 SNPs	453 pb
			98,6% (3)	6 SNPs	453 pb
		21P	100%	0 SNPs	455 pb
		25P	99,4%	3 SNPs	516 pb
	A	15 P	100%	0 SNPs	469 pb

*se eliminan las muestras correspondientes al paciente 5P por ser demasiado cortas y muy diferentes en homología a las demás → rango 98 % (10 SNPs) – 100% (0 SNPs)

➤ *β-Giardina*

Tabla 9. Assemblages obtenidos para el gen de la *β-Giardina* con la homología de las secuencias y los SNPs.

Secuencias		Paciente	Homología	SNPs	Nucleótidos
<i>β G i a r d i n a</i>	B	9P	99,7%	1 SNPs	471 pb
		10P	99,7% (2)	1 SNPs	471 pb
			99,5% (3)	1 SNPs	471 pb
	A	15P	99,5%	2 SNPs	449 pb
	A + B	21P	100% (B+B)	0 SNPs	471 pb
			92,9% (A)	33 SNPs	471 pb
		5P	92,9%	34 SNPs	480 pb

Análisis estadística de las secuencias

➤ *tpi*

Tabla 10. Análisis de variabilidad genética en las secuencias de los fragmentos amplificados de gen *tpi* obtenidos en el estudio.

Nº Paciente	% Homología	SNPs distintos Nº (IC 95%)	Total
1	98,7	6 (2,20 ; 13,07)	491
2	99,7	1 (0,03 ; 5,58)	497
5	95,0	8 (3,45 ; 15,77)	166
6	99,0	4 (1,01 ; 10,25)	492
9	100	0 (9 ; 3)	520
7	98,0	10 (4,79 ; 18,40)	530
10	98,6	6 (2,20 ; 13,03)	453
21	100	0 (0 ; 3)	455
25	99,4	3 (0,62 ; 8,77)	516
15	100	0 (0 ; 3)	469
TOTAL		(2,69 ; 5,22)	

Con una confianza del 95%, el número de SNPs diferentes entre la primera y la segunda tipificación en el conjunto de los 10 pacientes analizados oscila entre 2,69 y 5,22. En 4 de estos casos se observa una discrepancia de 6, 8, 10 y 6 SNPs diferentes entre ambos análisis, valores que superan el límite superior del intervalo de confianza para el total, mientras que en otros 4 pacientes, el número de discrepancias obtenido no alcanza el límite inferior del intervalo de confianza global (1, 0, 0 y 0). Sin embargo, y dado el solapamiento de los intervalos de confianza, las diferencias observadas no alcanzan la significación estadística para un nivel de significación global del 0,05.

➤ *β-Giardina*

Tabla 11. Análisis de variabilidad genética en las secuencias de los fragmentos amplificados de gen *β-Giardina* obtenidos en el estudio.

Nº Paciente	% Homología	SNPs distintos Nº (IC 95%)	Total
9	99,7	1 (0,03 ; 5,58)	471
10	99,7	1 (0,03 ; 5,58)	477
15	99,5	2 (0,24 ; 7,23)	449
TOTAL		(1,10 ; 10,25)	

Con una confianza del 95%, en número de SNPs diferentes entre la primera y la segunda tipificación en el conjunto de los 3 pacientes analizados oscila entre 1,10 y 10,25. No existen diferencias estadísticamente significativas en el número de SNPs diferentes entre ambos análisis entre los pacientes analizados ni con el global.

Tabla 12. Análisis de variabilidad genética en las secuencias de los fragmentos amplificados de gen *β-Giardina* obtenidos en el estudio.

Nº Paciente	% Homología	SNPs distintos Nº (IC 95%)	Total
21	92,9	33 (8,39 ; 23,50)	471
15	92,9	33 (8,39 ; 25,5)	480
TOTAL		(25,59 ; 42,56)	

Con una confianza del 95% el número de SNPs diferentes entre la primera y la segunda tipificación en el conjunto de los 2 pacientes analizado oscila entre 2,9 y 42,56, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en el número de SNPs diferentes entre ambos análisis entre los pacientes analizados ni con el global.

DISCUSIÓN

CRYPTOSPORIDIUM SPP.

En este trabajo se ha estudiado la prevalencia de las especies, genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* spp. que afectan a humanos, en España, concretamente en las provincias de Zaragoza y León, y a ellos se añade el estudio de un brote acontecido en una guardería de la Provincia de Granada, que afectó a 6 niños.

Todas las muestras estudiadas en este trabajo, excepto 4, procedían de niños entre 0 y 9 años, aunque el 93% de estos casos se da en niños de entre 0 y 5 años, y dentro de él, es el intervalo comprendido entre 1 a 4 años el que incluye la mayor parte (76%), igual que ocurre en el trabajo realizado por Waldron et al. en 2011 en Sídney, Australia (Waldron et al., 2011). Los resultados obtenidos para la provincia de Zaragoza se pueden comparar con los descritos en el estudio realizado por Llorente et al., en 2007, donde el mayor porcentaje de los casos estudiados de cryptosporidiosis se daba en niños entre 1-4 años y fue de 64 %, algo inferior al encontrado en este estudio, que alcanza el 82%. Por el contrario, en otras zonas geográficas la mayor prevalencia se da en niños de 5 – 12 años, como ocurre en el estudio de Soba et al., publicado en el año 2006 y realizado en Eslovenia, donde la prevalencia de cryptosporidiosis en el grupo de niños de 5 a 12 años (34%) era algo más elevada que en los de 1 a 4 años (28%) (Soba et al., 2006). Como ya es sabido, los niños constituyen una población sensible para estas infecciones, probablemente por su contacto en guarderías y zonas de juego y por la mayor dificultad para controlar determinados hábitos higiénicos que favorecen la transmisión de la cryptosporidiosis. También se pone de manifiesto la diferencia que existe entre diferentes zonas geográficas, en las que sin duda deben influir los diferentes hábitos higiénicos propios de la población seleccionada. Por otra parte, la cryptosporidiosis no era en este periodo una enfermedad de declaración obligatoria por lo que muy probablemente su prevalencia se encuentra subestimada en todas las edades. En el futuro, después de su inclusión en la lista de enfermedades de declaración obligatoria en marzo de 2015, es muy posible que los datos acerca de su prevalencia puedan cambiar.

En este estudio, el género no aparece asociado a la susceptibilidad a la cryptosporidiosis, ya que la proporción entre los dos sexos se encuentra equilibrada en torno al 50% aproximadamente, como ya encontraron Sulaiman et al., en 2005, en un estudio realizado en Kuwait, donde la proporción fue del 60 % y el 40 % de mujeres y hombres infectados respectivamente. Dado que la población estudiada está compuesta por niños pequeños, las actividades realizadas por ellos son similares para ambos géneros y por lo tanto la susceptibilidad para la adquisición de *Cryptosporidium* no depende de este factor.

Cuando se observa la distribución de casos por año de recogida de las muestras, llama la atención el repunte de casos que se produce en los años 2009, 2012 y 2013. El mayor número de muestras corresponde al año 2012, con más de 50 casos, seguido por los años 2013 y 2009, con más de 25 y 20 casos respectivamente. Considerando los mecanismos de transmisión de *Cryptosporidium*, es posible que se den aumentos cíclicos de la enfermedad, pero también es posible que el repunte se haya visto favorecido por las medidas de reducción económica impuestas en todos los sectores y que afectan a la depuración de aguas, pero también a los medios disponibles por las familias para el mantenimiento de las medidas higiénicas que se tenían en los años anteriores.

Ciento cincuenta y tres muestras de heces, del total de 194 estudiadas resultaron positivas, lo que supone un 78%. Hay que considerar que se trata de muestras previamente diagnosticadas como positivas para *Cryptosporidium* spp. en el Servicio de Microbiología del Hospital de procedencia, utilizando técnicas de microscopía. Sin embargo, la observación microscópica posterior, previa a la genotipificación, solo permite detectar ooquistes en el 45% de las muestras analizadas. Esto puede ser debido a problemas con la tinción o a la alteración de los ooquistes debida al almacenamiento. Las técnicas de tipificación molecular han permitido detectar otras 53 muestras positivas, que habían sido negativas por microscopía, sugiriendo mayor sensibilidad de las técnicas moleculares frente a las observaciones microscópicas.

Los estudios de cryptosporidiosis en humanos en España con caracterización molecular de los especies no son muy numerosos. Las últimas publicaciones acerca de la caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp. en España, son la de Navarro-i-

Martínez et al. del año 2013 de Madrid y La Coruña (Navarro-i-Martínez et al., 2013) y la del Ramo et al. de 2015 de la provincia de Zaragoza (Ramo et al., 2015). En el primer estudio se analizaron 23 muestras procedentes de Madrid y 72 muestras procedentes de La Coruña, todas positivas para *Cryptosporidium* spp. En resultado se han visto 40 casos de infección por *C. parvum*, 30 por *C. hominis* y dos por *C. meleagridis*. En el segundo estudio se analizaron 44 muestras procedentes de pacientes de Zaragoza, de los cuales 41 resultaron ser *C. hominis* y 3 *C. parvum* (Navarro-i-Martínez et al., 2013). En el estudio de Zaragoza se han identificado 4 subtipos con el método de GP60: IbA10G2, IaA24R3, IIaA15G1R1 y IIaA15G2R1 (Ramo et al., 2015). Anteriormente, el estudio realizado por Llorente et al. (2007), refleja las especies de *Cryptosporidium* circulantes en Aragón, habiéndose encontrado *C. hominis* y *C. parvum* habituales en el hombre, pero también *C. meleagridis* y *C. felis*, como especies de transmisión zoonótica. También se hace referencia a las diferentes proporciones que se encuentran de cada especie en los ámbitos rural y urbano (Llorente et al., 2007).

Los resultados aquí obtenidos coinciden con los obtenidos por Navarro-i-Martínez et al., en el año 2013, que estudiando muestras de *Cryptosporidium* en dos localizaciones de España, Madrid y La Coruña, obtuvieron un porcentaje de muestras positivas de un 81%, con la diferencia de que en este estudio la prevalencia de *C. parvum* fue mayor frente a *C. hominis*.

Especies

En este trabajo se identificaron 4 especies de *Cryptosporidium*: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. ubiquitum*, y *C. felis*, siendo la más prevalente *C. hominis* con un 75,1% (115/153) de los casos, frente al 22,9% (35/153) de *C. parvum* y al 2 %, con 2 y 1 muestras de *C. ubiquitum* y *C. felis* respectivamente. La alta proporción de *C. hominis* en el estudio se puede deber a la alta proporción existente de pacientes de origen urbano (65%) frente al rural (28%), sin olvidar que en el medio rural, en todos los casos considerados, *C. hominis* también ha resultado la especie con mayor prevalencia. Sin duda pues, el hecho de que *C. hominis* tenga un mecanismo de transmisión prioritario persona a persona, frente al más zoonótico *C. parvum*, debe de jugar un importante papel en su diseminación. No obstante el nivel de diseminación de *C. parvum* demuestra que la transmisión persona a persona juega también un papel importante en ella.

Además, es preciso tener en cuenta que muchos de los ámbitos rurales actuales tienen una mayor actividad como poblaciones residenciales y dormitorio que como propiamente dedicados a actividades rurales y ganaderas.

Ya en el año 2007, en un estudio realizado en Aragón por Llorente et al., encuentran una prevalencia de *C. hominis* del 63.9% frente a un 31.5% de *C. parvum*. Aparecen en ese estudio también *C. meleagridis* y *C. felis* como especies con baja prevalencia y que sugieren que la transmisión zoonótica puede ser más habitual de lo sospechado al haberse desarrollado la infección en personas inmunocompetentes (Llorente et al., 2007). Otros autores también han obtenido resultados similares. Así, por ejemplo Waldron et al., en el año 2011, en Sídney, analizaron 447 muestras, de las que un 66% resultaron *C. hominis* (Waldron et al., 2011) y Jex et al., en el año 2008, en Australia, investigando 62 muestras de humanos obtuvieron un 61% de *C. hominis*. (Jex et al., 2008). También en Inglaterra, Hunter et al., en el año 2007, encontraron un 62% de *C. hominis* (Hunter et al., 2007). Sin embargo, en el estudio realizado en 2013 en España por Navarro-i-Martínez et al., la prevalencia de *C. parvum* fue mayor que la de *C. hominis* (51.9% frente al 39%, respectivamente) (Navarro-i-Martínez et al., 2013), aunque no son los únicos con estos resultados, ya que otros trabajos obtienen una mayor proporción de *C. parvum* como los realizados en el año 2005 en Kuwait, con un 90% de *C. parvum*, (Sulaiman et al., 2005), en 2006 Eslovenia (Soba et al., 2006) y en USA (Feltus et al., 2006). En la transmisión de *C. parvum* interviene la vía zoonótica pero también se puede transmitir de persona a persona. Por ello, son necesarios más estudios de subtipos de *C. parvum* para determinar sus vías de transmisión más frecuentes.

Cryptosporidium ubiquitum y *Cryptosporidium felis*, encontrados en 2 y 1 pacientes respectivamente son las dos especies identificadas en este trabajo que no son tan frecuentes en humanos.

Cryptosporidium ubiquitum, anteriormente denominado Genotipo cervino, fue encontrado por primera vez en Canadá en el año 2002 (Ong et al., 2002). El cambio de denominación se debe a su amplia distribución geográfica y de hospedadores, ya que ha sido encontrado frecuentemente en muchos rumiantes salvajes y domésticos, como ovejas, cabras, ciervos, búfalos, roedores (ardillas, castores, puercoespines, ratones y jerbos), carnívoros (mapaches) y primates (lémures y humanos) (Li et al., 2014). Las

publicaciones llevadas a cabo hasta la fecha revelan que *C. ubiquitum* ha sido encontrado en humanos en Canadá, Nueva Zelanda, Inglaterra, Eslovenia, Reino Unido y Estados Unidos (Fayer et al., 2010).

En este trabajo se describen los dos primeros casos de *Cryptosporidium ubiquitum* identificados en España en humanos. El primer caso corresponde a un niño de 6 años de la provincia de León que tenía contacto frecuente con ovejas (Cieloszyk et al., 2012). El otro caso corresponde a un niño de 4 años de la provincia de Zaragoza del que se desconoce si tenía contacto con animales. La secuencia obtenidas para el fragmento estudiado del gen *SSU* del aislamiento de esta especie identificado en este estudio presentó una homología del 100% cuando se compararon 117 pb con la muestra identificada en Venezuela del año 2015, también procedente de muestras de origen humano (Blanco et al., 2015). La secuencia obtenida para *C. ubiquitum* identificado en una muestra de León permitió la comparación de un fragmento mucho más grande, de 440pb, y mostró una homología del 99,5% con la muestra identificada en Venezuela (Blanco et al., 2015). Esta alta homología podría indicar una baja variabilidad genética en el gen *SSU* de *C. ubiquitum*, o la mayor capacidad de un subtipo determinado para la transmisión animal-humano, pero esto es algo que requiere posteriores estudios mucho más profundos.

Cryptosporidium felis fue encontrado por primera vez en un gato de Japón por Iseki (Iseki, 1979). En humanos, esta especie fue descrita por primera vez por Pieniazek et al., en 1999, en pacientes VIH positivos. Hasta la fecha, *C. felis* ha sido reportado en varios países, incluido España. En este país se ha encontrado en un niño adoptado, procedente de un orfanato de la India (Llorente et al., 2006). En la mayoría de los casos *Cryptosporidium felis* fue encontrado en pacientes con inmunodeficiencia, como también lo fue el caso que se describe en este trabajo de un paciente adulto, varón de 49 años con VIH positivo, residente en el área rural de Zaragoza (Cieloszyk et al., 2012). La secuencia del fragmento del gen *SSU* del aislamiento de *C. felis* identificado en el año 2011 presentó una homología de 96,7 % cuando se comparó un fragmento de 789 pb con la obtenida para el aislamiento procedente de muestra humana encontrada en China y publicada en el año 2012. Como ya se ha comentado anteriormente, la declaración de la cryptosporidiosis era voluntaria en este periodo, lo que lleva a pensar

que su prevalencia se encuentra subestimada, pero cuando se trata de estudiar la prevalencia de las especies circulantes, esta cuestión se hace particularmente problemática ya que además no todos los aislamientos que se identifican de *Cryptosporidium* son caracterizados ni en su especie ni en el subtipo. Esto implica que es probable que la transmisión zoonótica sea más frecuente de lo que se sospecha y son necesarios estudios que cubran amplias zonas geográficas y que incluyan personas infectadas sintomáticas y asintomáticas para ver la verdadera importancia de la transmisión zoonótica y se puedan caracterizar los subtipos capaces de llevarla a cabo.

Estructura de la población estudiada en general

Distribución de los casos según su origen

Como ya se ha comentado anteriormente, de todas las muestras positivas, el 64,7% de los pacientes habitaban en el medio urbano mientras que solo el 28,1% lo hacía en el medio rural. Analizando la distribución de las especies de *Cryptosporidium* se puede observar que en todos los casos estudiados, la prevalencia de *C. hominis* es mayor tanto en el medio urbano (74%) como en el medio rural (77%). Los datos obtenidos difieren de los encontrados en Eslovenia en el año 2006, donde más del 90 % de los aislamientos pertenecían a *C. parvum*, con el 66% de los pacientes habitando en el medio rural. Las únicas dos muestras de *C. hominis* identificadas en este estudio vienen uno del medio urbano y otro del medio rural. (Soba et al., 2006)

Se podría pensar que los aislamientos de *C. parvum*, al ser una especie con mayor tasa de transmisión zoonótica por contactos con animales o con insectos que tienen contacto con animales y con sus heces, deberían de tener una mayor proporción en el medio rural, como ocurría en el caso del estudio de Eslovenia (Soba et al., 2006). Sin embargo, en este estudio no necesariamente es así, ya que las muestras de *C. parvum* investigadas procedían en su mayoría de pacientes que habitaban en el medio urbano. Esto sugiere una participación en la transmisión del consumo de alimentos o aguas contaminadas y de la transmisión persona-persona, o que dichas personas han residido un periodo de tiempo en áreas rurales y regresan con cryptosporidiosis. Tampoco se

puede hacer una comparación con muchos de los otros lugares del mundo ya que los datos del medio en el que habitan los pacientes en muchos trabajos no se estudian por lo que las publicaciones carecen de estos datos.

Estacionalidad

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre especie y el mes de aislamiento. Sin embargo, cuando se tomaron todas las muestras en conjunto se observó un aumento de casos de *Cryptosporidium* spp. en el tercer cuatrimestre del año (46% frente al primer cuatrimestre con 24%), que coincide con el momento en que los niños vuelven a colegios y guarderías después de las vacaciones de verano. En estudios similares, realizados en Kuwait, por Sulaiman et al., en 2005 se observaron resultados diferentes a estos ya que el pico de aumento de casos se producía en el I cuatrimestre, con un 63% de los casos, mientras que en el tercero solo se daban el 19% de los casos. Por otro lado en este estudio, el número más pequeño de casos se observa en el primer cuatrimestre de año, coincidiendo con los meses de más frío, con unas actividades en grupo de los niños. También hay que tener en cuenta que los calendarios escolares y la climatología de los países son muy diferentes.

Edad

Considerando que se ha tomado como muestra para el estudio todos los casos de cryptosporidiosis ocurridos en el periodo estudiado, se aprecia una mayor prevalencia de cryptosporidiosis entre los niños de 0 a 4 años de edad (85,9%), resultado que coincide con los obtenidos por Waldron et al. en un estudio realizado en Australia en el año 2011 (Waldron et al., 2011). Se observa que en todos los grupos de edad *C. hominis* es la especie predominante, siendo ligeramente mayor la proporción de *C. parvum* en el grupo de edad de 5-10, comparando con el de 0 - 4 años. Este resultado no resulta extraño ya que los niños pequeños interaccionan más entre ellos, tanto en guarderías como en parques infantiles, facilitando la transmisión del parásito, en este caso *C. hominis*, la especie con mayor transmisión persona-persona, mientras que los niños más mayores adquieren menos la infección. Solo 4 muestras de todas las analizadas pertenecían a personas adultas, de las cuales 3 presentaban co-infección con VIH y 1 había realizado un viaje a India. No aparece *C. parvum* en el grupo de edad de adultos,

aunque el número de casos en este grupo de edad es muy pequeño para sacar conclusión al respecto.

Es probable que la infección por *Cryptosporidium* no desarrolle tanta sintomatología en pacientes adultos, lo que haría que estos no acudan al médico y eliminen el parásito por si mismos, ya que la infección es autolimitada en casos en que no se encuentra inmunodeficiencia (Trotz-Williams et. al., 2006). Esto explicaría la baja prevalencia en adultos, aun estando en estrecho contacto con niños que padezcan la infección. La agrupación por edades escolares muestra que la proporción de *C. parvum* aumenta con la edad, siendo la mayor proporción de *C. hominis* la que se da en los niños en edad de guardería. No se dispone en este estudio de datos que confirmen si los niños que forman parte del estudio acuden a guarderías, pero sin duda la diferencia en las proporciones está relacionada con las distintas actividades y costumbres propias de cada edad.

Género

Aunque no se observó asociación estadísticamente significativa entre género y especie de *Cryptosporidium*, se aprecia que en el caso de *C. hominis* el número de casos fue igual entre hombres y mujeres mientras que para *C. parvum* el mayor número de casos se da entre los varones. Estos resultados difieren del estudio realizado por Waldron et al. en el año 2011, en Australia, donde la prevalencia entre las mujeres era mayor tanto en caso de *C. hominis* (78 casos en mujeres frente a 67 casos en varones) como el *C. parvum* (38 casos en mujeres frente a 32 casos en varones) (Waldron et al., 2011). Parece evidente que las diferentes costumbres y hábitos de cada país son las responsables de estas diferencias, pudiendo achacarlas a las distintas actividades realizadas por hombre y mujeres en cada cultura.

Subtipos

En este trabajo se han subgenotipado 102 muestras utilizando un fragmento de glicoproteína GP60, 80 de ellas pertenecientes a la especie *C. hominis* y 22 a *C. parvum*. Dos de las muestras no se han podido subgenotipar.

De todas las familias de genotipos descritos predomina la Ib, que corresponde a *C. hominis* y que se ha detectado en 72 muestras. Dentro de ella, el subtipo más prevalente es el IbA10G2R2, que se ha visto en 67 pacientes (66% de todos los subtipos de este trabajo). Este subtipo se ha encontrado en humanos en Australia (Jex et al., 2008) y Malasia (Lim et al., 2011) y como causa de un brote de cryptosporidiosis en Navarra (España) (Fuentes et al., 2014). Sin embargo, hay evidencias de que el subtipo IbA10G2R2 está distribuido mundialmente, y ha sido reportado en 28 países, ninguno de ellos en América del Sur (Jex and Gasser 2010). En este caso, hay un predominio en el ámbito urbano (64%) frente al rural (27%), donde ha sido el único subtipo de *C. hominis* detectado. Todo esto es acorde con su aparente capacidad de diseminación, como lo demuestra también el hecho de que entre los subtipos de *C. hominis* identificados, este subtipo supone un 82,5%. Por otra parte, existe una controversia en lo que respecta a la nomenclatura recibida por alguno de los subtipos. Así, el subtipo denominado IbA10G2 por Ramo et al., 2015, en el presente trabajo pasa a denominarse IbA10G2R2, con una homología en la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 463 pb del 100%. La diferencia de nomenclatura está basada en la aparición en la secuencia de nucleótidos, de una repetición “ACA” al final de la región de repeticiones de trinucleótidos que codifican serina, denominándolo IbA10G2, en lugar de IbA10G2R2. Por ello, las 40 secuencias de este trabajo con homología 100% de IbA10G2R2 presentan 100% de identidad con la publicada por Jex et al., en 2008, y registrada en base de datos con número EU379544.1 y con el mismo nombre IbA10G2R2, pero también son idénticas a algunas secuencias registradas con el nombre IbA10G2 como por ejemplo la registrada por Waldron et al., en 2009, con el FJ861236.1. En este trabajo, se ha optado por considerarlas repeticiones siguiendo el esquema de nomenclatura que se especifica a continuación utilizando un código de colores:

Una secuencia del tipo:
 TCATCATCATCATCATCATCGTCATCATCGTCAACAACA se denomina
 IbA10G2R2.

Otros estudios en que se sigue la misma nomenclatura utilizada en este estudio son (Jex, Gasser., 2008, Lim et al., 2011, Nolan et al., 2013, Pangasa et al., 2010 y Fuentes et al., 2014).

De las 67 muestras que contenían el subtipo IbA10G2R2, solo 55 se pudieron comparar, tomando un fragmento común de 319 pb. Los resultados mostraron que 40 de ellas presentan un 100% de homología en este fragmento. De ellas, 26 procedían de pacientes de Zaragoza y 14 de León. Esto demuestra que el subtipo IbA10G2R2 se está diseminando en zonas estudiadas de Zaragoza y León, lo que hace pensar que se puede encontrar extendido por todo el norte de país. Por otro lado, la secuencia que más diferencias presenta dentro de los subtipos IbA10G2R2, es la 192G que es del sur de España, de la provincia de Granada. Eso indica algunas variaciones dentro del mismo subtipo IbA10G2R2, que podrían estar relacionadas con la región del país en que se localizan. En este sentido, si bien es verdad que han sido del que mayor número de secuencias se ha obtenido para poder comparar, también es cierto, que dentro de este estudio es el subtipo que ha mostrado una mayor variabilidad genética en el fragmento analizado del gen *gp60* [93% - 100%]. Esto sugiere la necesidad de estudios que lleven a cabo la vigilancia de la evolución de este subtipo con gran capacidad de diseminación.

Si se tienen en cuenta los problemas de nomenclatura descritos anteriormente, algunos de los subtipos nombrados IbA10G2 son iguales a los que aparecen con nombre IbA10G2R2, con lo que la distribución de este subtipo es mucho más amplia de lo inicialmente supuesto.

Además del subtipo IbA10G2R2, se han encontrado otros 3 subtipos de la misma familia Ib: IbA12G3R2, IbA9G2R2 y IbA9G3R2.

El IbA9G3R2 es, según Jex and Gasser (2010) el segundo más reportado de los subtipos de la familia Ib. Se ha visto en 9 países, entre otros Inglaterra (Pangasa et al., 2010) y Australia (Jex et al., 2008). En este trabajo, este genotipo y el IbA9G2R2 se han visto solo en un paciente. Este último subtipo fue reportado también en Australia por Waldron et al., en 2009.

El subtipo IbA12G3R2 no es muy frecuente. Hasta la fecha hay una publicación en la que se describe la identificación de este subtipo en Inglaterra (Pangasa et al., 2010). En el presente trabajo se ha encontrado este subtipo en 3 pacientes, todos ellos niños de 1 y 3 años, habitantes del ámbito urbano de la provincia de León. Las tres muestras fueron recogidas en el año 2009, dos de ellas en diciembre y la otra en marzo.

Las secuencias correspondientes presentaron entre ellas una homología del 99%, comparando un fragmento de 617 pb lo que demuestra que los casos se encuentran epidemiológicamente relacionados. No se puede hablar en este caso de un brote ya que hay diferencia de varios meses entre la recogida de las muestras, pero sugiere la presencia de un reservorio de este subtipo en León para que los casos de marzo y diciembre se encuentren relacionados. Las muestras presentaron también una homología del 99% con la secuencia del gen *gp60* de *Cryptosporidium* procedente de una muestra recogida en Inglaterra y reportada por Pangasa et al., en el año 2010. Los años cercanos y la muy alta homología entre las secuencias pueden indicar que este subtipo se puede intercambiar entre los países a través de viajeros porque el tráfico es bastante frecuente entre España e Inglaterra, aunque este extremo no puede asegurarse. Haría falta más investigación en cuanto a los subtipos que aparecen en los países con mucho tráfico de viajeros.

Otra familia de subtipos de *C. hominis* que se investigó en este trabajo es la Ia que se ha visto en varios países del mundo, entre otros Japón, Nepal, Pakistán, Perú, Egipto, India, Malawi, África del Sur y España (Jex and Gasser, 2010).

Aquí, se detecta este subtipo en 6 muestras procedentes de niños de Granada, en un brote de una guardería.

La familia de subtipos Ie no es tan frecuente como la Ib pero se ha visto en varios países, incluyendo 2 muestras en España, en Barcelona (Segura et al., 2015). En este trabajo aparece una muestra con el subtipo IeA11G3T3, procedente de un niño de 2 años de León. El subtipo mencionado se ha visto en países como Canadá (Trotz-Williams et al., 2006), Inglaterra (Hadfield et al., 2011), Portugal (Alves et al., 2006), México (Valenzuela et al., 2014) y España (Segura et al., 2015).

La única muestra de la familia If de *C. hominis* que se encontró en este trabajo fue IfA13G1. Este subgenotipo no se ha descrito hasta ahora en Europa. Hay publicaciones que revelan que se ha encontrado en Bangladesh (Hira et al., 2011), Australia (Koehler et al., 2013) e India (Sharma et al., 2013). La secuencia del subtipo IfA13G1 descrita en este trabajo presenta homología del 100% con la muestra de India descrita por Sharma et al. en el año 2013. En el caso del presente trabajo la paciente diagnosticada con este

subtipo era una chica de 21 años que viajó previamente a India. En España este subtipo no ha sido reportado anteriormente, sin embargo, en India, las peores condiciones higiénico sanitarias favorecen no solo la mayor transmisión de estas enfermedades, sino también la circulación de una mayor variedad de subtipos, algunos de ellos de transmisión zoonótica. Los subtipos más parecidos al identificado en este trabajo son: el IfA12G1 que se ha descrito en Inglaterra (Hasfield et al., 2011) y en España (Segura et al., 2015) y IfA14G1 que se ha descrito en España (Segura et al., 2015).

De todos los subtipos de *Cryptosporidium hominis* aquí descritos, solo el IbA10G2R2 y el IaA11G3R3 se han descrito previamente en Europa y en España y el IbA12G3R2 y IbA9G3R2, en Europa en Inglaterra. Los otros dos subtipos, IaA11R2 y IfA13G1, no se encuentran descritos en Europa y España y se describen aquí por primera vez.

Trece de las muestras de *C. parvum* caracterizadas en este trabajo, procedían de León y las dos restantes de Zaragoza. Pertenecen a dos familias de subtipos: IIa y IId. Estas dos familias de subtipos se han encontrado tanto en humanos como en rumiantes y son las responsables de la mayoría de los casos de cryptosporidiosis tanto zoonóticas como antroponóticas (Feng et al., 2011).

La familia de subtipos IIa es la más cosmopolita. Se ha notificado en 26 países con 50 subtipos diferentes de los cuales los más publicados son IIaA16G2R1 y IIaA19G3R1 (Jex and Gasser, 2010). Sin embargo, ningún de estos dos subtipos ha sido detectado en este trabajo. El subtipo más común de la familia IIa que se detecta en la zona estudiada es el IIaA15G2R1 (en 6 muestras), seguido por el IIaA17G2R1, caracterizado en 5 muestras. Los subtipos mencionados, a excepción de una muestra del subtipo IIaA15G2R1 (identificada en Zaragoza), se han identificado en pacientes de León y todas en el ámbito urbano. Esta es la primera publicación del subtipo IIaA17G2R1 en humanos en España y la segunda del subtipo IIaA15G2R1 (descrito previamente en Barcelona por Segura et al. en 2015). Ambos subtipos han sido identificados previamente en ganado en España (Quilez et al., 2008). Esto demostraría la implicación de la transmisión zoonótica de estos subtipos de *Cryptosporidium*.

Comparando un fragmento de 309 pb de las secuencias correspondientes a los 6 aislamientos de *Cryptosporidium* subtipos IIaA15G2R1, se aprecia una homología del 99%. Las secuencias de los aislamientos procedentes de las 5 muestras de León, tienen una o dos sustituciones cada una, tomando como referencia la secuencia obtenida a partir de la muestra de Zaragoza. La muestra de Zaragoza, aislada en el año 2013 y la muestra de León, del año 2007, dan secuencias de 309 pb, que tienen una homología del 100% con la secuencia publicada por Trotz-Williams et al., (2006) registrada en el GenBank con número DQ192503.1, procedente de ganado, con las que se obtienen al analizar muestras de ganado de Zaragoza, España del año 2008 (Quilez et al., 2008) y 99% con las secuencias obtenidas al estudiar otras muestras de León del año 2012 y dos de 2013. Este subtipo es muy común tanto en Europa como en el resto de mundo. Se ha visto con mucha frecuencia tanto en humanos como en ganado. Sin embargo, en España, su identificación solo se ha publicado en ganado en Aragón (Quilez et al., 2008). En León se han visto más muestras que en Zaragoza con este subtipo. Además se puede suponer que tanto en León como en Zaragoza, existe un reservorio de este subtipo porque aparece en varios años.

El subtipo IIaA17G2R1 se está diseminando en León. Se ha visto en 5 muestras de esta región, no habiendo aparecido en Zaragoza en ninguna de las muestras. Por las diferencias de tamaño existentes entre las secuencias obtenidas, se comparó un fragmento de 182 pb, obteniendo homólogías entre el 82% al 100%, dando 3 muestras idénticas y en un fragmento mucho más largo de 744 pb, una homología entre 98% y 99% en 3 muestras. También se ha encontrado este subtipo en la investigación llevada a cabo por Quilez en el año 2008, en ganado en las granjas de norte de España. Esto demuestra nuevamente la transmisión zoonótica de este subtipo de *Cryptosporidium*, aunque serían necesarios más estudios, tanto en muestras de origen humano como animal para determinar la extensión de este y de otros subgenotipos de *C. parvum* en España.

Otros subtipos de la familia IIa identificados en este trabajo se han visto todos en una o dos muestras. El subtipo IIaA12G1R1 no se ha descrito hasta la fecha ni en humanos ni en animales. En Europa, en humanos y ganado, se han identificado los subtipos IIaA18G3R1 y IIaA19G2R1, y de ellos, el IIaA18G3R1 también se ha

detectado en ganado en España. En España, en Barcelona se ha publicado en humanos el subtipo IIA18G2R1 (Segura et al., 2015).

El último de los subtipos de la familia IIA identificado en este trabajo, el IIA13G2R1, se ha visto en dos muestras, una de León del año 2011 (niño de 3 años área urbana) y otra de Zaragoza del año 2013 (en un niño de 2 años del área urbana). La homología entre ellas en el fragmento de 320pb era de 99%. Este subtipo no ha sido identificado con anterioridad en España. En humanos se ha visto solo en Etiopía (Adamu et al., 2014) y Malasia (Iqbal et al., 2012) y en ganado entre otros en Bélgica (Geurden et al., 2007) y Holanda (Wielinga et al., 2008). Las secuencias aquí obtenida tienen una homología del 99% (la muestra con procedencia de Zaragoza) y de 100% (la muestra de León) con la correspondiente a *Cryptosporidium* del mismo subtipo identificada en Holanda (Wielinga et al., 2008) con número EF576971. La muestra de Holanda procede de ganado mientras que las de este trabajo son de humanos.

Pertenecientes a la familia IID, se han identificado 5 subtipos diferentes. Tres de ellos, el IIDA20G1b, IIDA21G1 y IIDA17G1, ya se habían detectado en humanos en Europa y de ellos, el IIDA21G1 ha sido identificado como causante de cryptosporidiosis en corderos en España y Rumania y también se ha descrito en una muestra en humanos en Barcelona, España (Segura et al., 2015). Otro subtipo identificado en muestras de León, pero con menor frecuencia, es el IIDA19G1. Las secuencias del gen *gp60* de *Cryptosporidium* procedente de dos muestras con este subtipo tienen una homología del 100% en un fragmento de casi 300pb. Igual que los otros dos anteriores, este subtipo se ha visto en España en el región de Aragón, pero solo en una muestra del ganado (Quilez et al., 2013). En humanos este subtipo se ha reportado solo en China y Etiopía.

El último de los subtipos identificado en la zona objeto de estudio, el IIDA29G1, según las publicaciones encontradas, hasta la fecha ha sido reportado solo en humanos en Jordania en el año 2010 (Hijawi et al., 2010) y presenta una homología de 99% con el subtipo de este trabajo visto en un niño de edad de 2 años en León en el año 2007. Por otro lado la secuencia de *Cryptosporidium* subtipo IIA17G1 procede de una muestra de una niña de 4 años de Zaragoza que fue recogida en el año 2012 y presenta homología del 98% con la muestra encontrada en el año 2011 en Inglaterra (Hijawi et

al., 2011), lo que puede indicar intercambio realizado a través de viajeros ya que el tráfico entre Inglaterra y Zaragoza es muy frecuente.

Como puede observarse, solo 2 de los subtipos de *C. parvum* notificados en este trabajo se han publicado previamente en España en humanos. Esto no es de extrañar, ya que es poco el tiempo que se lleva aplicando la técnica de subgenotipificación y los nuevos subgenotipos se van identificando conforme se van estudiando los aislamientos circulantes en cada población.

Hay que destacar que el subtipo IIdA20G1b, identificado solamente en humanos, en Kuwait y Suecia, se encontró en este trabajo en una muestra de una niña de 4 años de León, es el subtipo de la familia IIdA20G1 y subfamilia “b” porque presenta polimorfismos fuera de la región de repeticiones, en el sitio 249 que le diferencia del resto de los subtipos IIdA20G1. En Genbank está registrado con número de acceso AY738185.1 y presenta una homología del 99% con la muestra de Suecia (Silverlas et al., 2010) encontrada el mismo año 2010 como la de este trabajo. Esto puede suponer el contagio a través de los viajes. Sin embargo, esta información no se puede confirmar ya que supone un estudio aparte.

Como se ha comentado previamente, la mayor variabilidad se ha encontrado al analizar el subtipo IbA10G2R2, mientras que las homologías entre los fragmentos obtenidos para los aislamientos de otros subtipos son de 98%-100%. Si bien se ha demostrado en múltiples ocasiones que el análisis del fragmento utilizado del gen que codifica la glicoproteína GP60 permite la diferenciación entre diferentes subtipos, su capacidad para discernir entre aislamientos de un mismo subtipo no es muy clara.

Todos los subtipos descritos en este trabajo comparados con datos de otros trabajos y sus referencias se muestran en la tabla 1.

Analizando las asociaciones entre los subtipos encontrados y las demás variables estudiadas en el trabajo, no se ha encontrado ninguna asociación estadísticamente significativa. Sin embargo, se ha podido observar algunas tendencias, asociando los subtipos con edad del paciente, año o mes de la extracción de la muestra.

- Edad

Analizando el número y variedad de subtipos por edad de los pacientes se puede observar que el único subtipo que se ve en todos los rangos de edad es el IbA10G2R2. El resto de los subtipos en su mayoría se encontraron en pacientes entre 0 y 4 años de edad.

- Año

Analizando la aparición de casos de subtipos por año se observa que en cuanto al número de subtipos predomina el año 2012 (4 subtipos diferentes con prevalencia de IbA10G2R2). Sin embargo, la variedad es mayor en los años 2009 y 2013 (5 diferentes subtipos). El único subtipo que podemos observar en todos los años es el IbA10G2R2, siendo su prevalencia mayor en el año 2012 seguido por año 2009.

Tabla 1. Subtipos de *C. hominis* y *C. parvum* identificados en este trabajo comparados con datos de otras publicaciones y sus referencias.

Especie	Familia de genotipos	Subtipo	N°	Datos de otros trabajos		
				Hospedador	Localización	Referencia
<i>C. hominis</i>	Ia	IaA11R2	6	-	-	-
	Ib	IbA10G2R2	67	Humanos	Australia Malasia Malasia	Jex et al., 2008 Lim et al., 2011 Iqbal et al., 2012
		IbA12G3R2	3	Humanos	Inglaterra	Pangasa et al., 2010
		IbA9G2R2	1	Humanos	Australia	Waldron et al., 2009
		IbA9G3R2	1	Humanos	Australia Inglaterra	Jex et al., 2008; Pangasa et al., 2010
	Ie	IeA11G3T3	1	Humanos	Canadá Inglaterra Portugal Méjico España	Trotz-Williams et al., 2006 Hadfield et al., 2011 Alves et al., 2006 Valenzuela et al., 2014 Segura et al., 2015
	If	IfA13G1	1	Humanos	Bangladesh Australia India	Hira et al., 2011 Koehler et al., 2013 Sharma et al., 2013
	IIa	IIaA15G2R1	6	Ganado Yak	España Egipto Inglaterra Rumania Francia China	Quilez et al., 2008 Amer et al., 2010 Brook et al., 2009 Imre et al., 2011 Follet et al., 2011 Mi et al., 2013
<i>C. parvum</i>				Humanos	Brasil Republica Checa Inglaterra Holanda Portugal Etiopia Méjico Eslovenia España	Meireles et al., 2011 Kváč et al., 2010 Chalmers et al., 2010 Wielinga et al., 2008 Alves et al., 2006 Adamu et al., 2014 Valenzuela et al., 2014 Soba and Logar, 2008 Segura et al., 2015

Especie	Familia de genotipos	Subtipo	Nº	Datos de otros trabajos		
				Hospedador	Localización	Referencia
		IIaA17G2R1	5	Ganado	España Alemania Irlanda del Norte Holanda	Quilez et al., 2008 Broglia et al., 2008 Thompson et al., 2007 Wielinga et al., 2008
				Humanos	Ontario, Canadá Ohio, USA Etiopia Australia	Trotz-Williams et al., 2006 Blackburn et al., 2006 Adamu et al., 2014 Koehler et al., 2013
		IIaA18G3R1	1	Ganado	España Irlanda del Norte Holanda Nueva Zelanda Gales	Quilez et al., 2008 Thompson et al., 2007 Wielinga et al., 2008 Shrestha et al., 2014 Su Yin Ng et al., 2012
				Humanos	Australia Australia Gales Irlanda	Jex et al., 2008 Koehler et al., 2013 Su Yin Ng et al., 2012 Zintl et al., 2011
		IIaA19G2R1	1	Ganado	Irlanda del Norte Holanda Francia Brasil	Thompson et al., 2007 Wielinga et al., 2008 Rieux et al., 2013 Couto et al., 2013
				Ciervos	Australia	Nolan et al., 2013
		IIaA13G2R1	2	Humanos	Inglaterra	Haldfield et al., 2011
				Ganado	Bélgica	Geurden et al., 2007
		IIaA12G1R1	1	Ganado	Holanda	Wielinga et al., 2008
				Humanos	Etiopia Malasia	Adamu et al., 2014 Iqbal et al., 2012
		IIaA20G1b	1	-	-	-
				-	-	-
	IId	IIdA21G1	1	Humanos	Kuwait Suecia	Sulaiman et al., 2005 Silverlås et al., 2010
				Corderos	España Rumania	Quilez et al., 2008 Imre et al., 2013
		IIdA29G1	1	Ganado	Egipto	Amer et al., 2013
				Humanos	Portugal Egipto Irán España	Alves et al., 2006 Helmy et al., 2013 Ghaffari, Kalantari, 2014 Segura et al., 2015
		IIdA29G1	1	-	-	-
				Humanos	Jordania	Hijjawi et al., 2010

Especie	Familia de genotipos	Subtipo	Nº	Datos de otros trabajos		
				Hospedador	Localización	Referencia
		HdA19G1	2	Corderos, Cabras Ganado	España China	Quilez et al., 2013 Shang et al., 2013
				Humanos	China Etiopia	Wang et al., 2013 Adamu et al., 2014
		HdA17G1	1	Aguas	Portugal	Lobo et al., 2009
				Humanos	Etiopia Inglaterra	Adamu et al., 2014 Hadfield et al., 2011

Estructura de las poblaciones circulantes de *Cryptosporidium* por ciudades

León

Distribución de los casos según su origen

Analizando la distribución de los casos procedentes de León se observa que la proporción de los pacientes infectados que habitan en el medio urbano es mucho mayor que los que habitan en el medio rural (73% en el urbano frente a 23% en el medio rural). Esto puede deberse a que el hospital de referencia está ubicado en la ciudad y la mayoría de los pacientes atendidos allí vienen de la misma ciudad de León.

Estacionalidad

En cuanto a estacionalidad en León, observamos que los casos aumentan en el tercer cuatrimestre del año (49%), dándose el menor número de casos en el segundo cuatrimestre (18%). La mayor prevalencia en el tercer cuatrimestre hace pensar en la vuelta de los niños a los colegios y guarderías, donde un mayor contacto favorece la transmisión. El menor número de casos al comienzo de la primavera, hace pensar que con el buen tiempo, las actividades de la población hacen disminuir el contacto entre personas y por tanto la transmisión.

Asociaciones con subtipos

Edad

En León podemos apreciar una variedad de subtipos mucho mayor que en el caso de Zaragoza. De todos los subtipos identificados la mayoría aparece en el rango de edad de 0 a 4 años. El único subtipo que podemos observar en todos los rangos de edad es el IbA10G2R2.

Año

En León el mayor número de casos se sitúa en el año 2009, en el que también se encuentra la mayor variedad de subtipos - 5 diferentes subtipos, igual que en el año 2010.

Mes

Analizando el número de subtipos y la variedad de ellos por meses, la mayor variedad y número de subtipos se da en León, en el mes de diciembre con 6 subtipos diferentes y un número total de 11 subtipos).

IbA10G2R2

Se analizó la estacionalidad del subtipo IbA10G2R2 por mes y año en León, no encontrando asociación estadísticamente significativa.

No obstante se observa que el número de los casos que aparecen en cada uno de los años es similar con un pequeño aumento en el año 2009. También podemos observar que el número de casos es un poco más elevado en los meses de invierno, en noviembre y diciembre.

Zaragoza

Distribución de los casos según su origen

En Zaragoza la proporción de los pacientes que habitan en el medio urbano es mayor que los que habitan en el medio rural (50% frente a 39,1%). Los resultados aquí obtenidos coinciden con los obtenidos también en Aragón en el año 2007, con un 52.2% de los pacientes habitando en el medio urbano, frente al 47.8% que habitaba en el medio rural (Llorente et al., 2007). Sin embargo, se puede observar también que en el año 2007, el 47,8% de las personas infectadas habitaban en el medio rural y en la actualidad ha disminuido hasta el 39,1%. La proporción de *C. hominis* en Zaragoza tanto en el medio urbano (88%) como en el rural (92%) es mucho mayor que la de *C. parvum*.

En el estudio realizado por Llorente et al, en Aragón, publicado en el año 2007, se observa que la proporción de *Cryptosporidium* en ambos medios era casi igual (47,8% en el medio rural frente a 52,2% en el urbano). Sin embargo, la mayor proporción de *C. parvum* en el medio rural era evidente (20,7% frente a 9,8% en el medio urbano). *C. hominis* se había encontrado más en el medio urbano pero con menos prevalencia que el caso de *C. parvum* (40,2% en el medio urbano frente a 23,9% en el medio rural).

Estacionalidad

En Zaragoza el mayor número de casos ocurre en el segundo cuatrimestre del año (50 %) y el número más pequeño en el primero (17%). El mayor número de casos coincide con el inicio de la primavera y por lo tanto con el aumento de las actividades al aire libre, por lo que se puede pensar en una posible influencia de la vía de transmisión ambiental. El menor número de casos se da en la temporada más fría en que las actividades al aire libre disminuyen, lo que avala esta hipótesis.

Asociaciones con subtipos

Edad

En Zaragoza, la variedad de subtipos es mucho menor que en León. Podemos observar que los dos únicos subtipos de *Cryptosporidium hominis* que aparecen en Zaragoza son IbA10G2R2 y IfA13G1 de los cuales el último podría no ser autóctono, porque se encontró en una mujer que viajó previamente a India. Es también el único subtipo en Zaragoza que aparece en el rango de edad de más de 18 años. En las muestras correspondientes al intervalo de edad de 5 a 10 años, se ha identificado solamente el subtipo IbA10G2R2, en un porcentaje inferior al encontrado en el rango de 0 a 4 años, en que aparece junto con otros dos subtipos que pertenecen al género *C. parvum* (IIdA17G1, IIaA13G2R1).

Año

En Zaragoza podemos apreciar el mayor número de casos en el año 2012 con la mayor prevalencia de subtipo IbA10G2R2. Esto coincide también con lo encontrado en León, con lo que se puede especular con la posibilidad de que en este año, la prevalencia de este subtipo ha podido ser elevada en el conjunto de España.

Mes

En Zaragoza la variedad de subtipos es mucho menor que en León y el subtipo que destaca es el IbA10G2R2, que aparece en todos los meses del año excepto diciembre y enero con su mayor prevalencia en septiembre (8 casos).

IbA10G2R2

Analizamos la estacionalidad del subtipo IbA10G2R2 por mes y año en Zaragoza. No obstante, no se encontró asociación estadísticamente significativa, pero si se observa un aumento considerable de casos en el año 2012, que no se ha repetido en 2013, ni tampoco se observa en años anteriores.

El último año, se ha publicado la estructura de la población de *Cryptosporidium* en dos ciudades españolas. Se han comparado los datos de este trabajo con los de los

últimos dos artículos publicados del tema de subgenotipos de *Cryptosporidium* spp en España, uno de Zaragoza (Ramo et al., 2015) y otro de Barcelona (Segura et al., 2015).

En el estudio realizado en Zaragoza se observa que los datos coinciden con los presentados en este trabajo en cuanto al número de subtipos de *C. hominis* encontrados, ya que en este trabajo el subtipo más prevalente fue IbA10G2R2 que se ha encontrado en el 88% (37 de 42 muestras) de todos los subtipos de Zaragoza, siendo el único (aparte de una muestra de IfA13G1) que se detectó en la zona, mientras que en el trabajo de Ramo et al (2015), la prevalencia de este subtipo fue 80% (35 de 44 subtipos).

En el estudio de Ramo et al (2015) se describe la estructura de las poblaciones de *Cryptosporidium* que se diseminan entre la población infantil de Zaragoza. Para ello, se caracterizan 44 muestras de heces procedentes de niños de entre 1 y 5 años de edad, recogidas en el año 2010. Los resultados por ellos obtenidos muestran un predominio del subtipo IbA10G2 que se encontró en 35 muestras (79,5%). Los otros subtipos encontrados en el estudio de Ramo et al., fueron el IaA24R3 (en 6 muestras), el IIaA15G1R1 (en 1 muestra) y el IIaA15G2R1 (en 2 muestras). En el presente estudio no se han detectado los dos primeros subtipos. En cambio se han detectado los siguientes subtipos uno en cada muestra: IfA13G1, IIaA15G2R1, IIaA13G2R1, IIdA21G1, IIdA17G1 y el subtipo predominante IbA10G2R1 en 37 muestras (88,1%). El porcentaje de las muestras con el subtipo IaA10G2R2 en el estudio de Ramo et al (2015) y en el presente es parecido, sin embargo, este estudio se ha hecho con muestras recogidas durante un periodo de 7 años. Además, los otros subtipos descritos aquí no coinciden (excepto el IIaA15G2R1) con los descritos por Ramo et al (2015), lo que puede indicar que las poblaciones de *Cryptosporidium* se modifican con el subtipo IbA10G2R2, adaptado al medio y variación del resto de los subtipos.

En otro estudio similar, de Segura et al., publicado en el 2015, en el que se caracterizan las poblaciones de *Cryptosporidium* que se han diseminado durante 5 años consecutivos (2004-2009) en Barcelona, se puede observar que los resultados allí obtenidos coinciden con los obtenidos en este estudio, en cuanto a la distribución por meses y por edad de los pacientes. Además, se han descrito las mismas familias de

subtipos que en nuestro estudio excepto de la familia Id que se ha descrito solo en el estudio de Segura et al. (2015) y la familia Ia que se ha descrito solo en este estudio.

Granada

Con los resultados de las muestras procedentes de Granada no se hizo el análisis de asociación porque la cantidad de las muestras no lo permitía. Las muestras procedían del brote detectado en una guardería de Granada que afectó a niños menores de 4 años de edad aunque, posteriormente resultó que solo 6 de ellas correspondían al brote, mientras las otras 3 correspondían a muestras de otros pacientes. De las 6 muestras que resultaron ser del brote, 5 contenían el subtipo IaA11R2. Es un subtipo novedoso que se describe por primera vez en este trabajo, siendo el más parecido detectado hasta la fecha el IaA11R3, encontrado en Bangladesh (Hira et al., 2011). Otros similares son IaA11R4 de Perú (Cama et al., 2008), IaA19R3 de Portugal (Alves et al., 2006) y Canadá (Trotz-Williams et al., 2006), IaA17R1 en Australia (Jex et al., 2008) y IaA12R3 en Estados Unidos en un paciente que había viajado a Pakistán (Chalmers et al., 2008). En esta misma guardería, se encontró además, un paciente cuya muestra contenía el subtipo IbA10G2R2. (Goñi et al., 2014). Otra muestra con el mismo subtipo IaA11R2 fue diagnosticada en un niño de otra guardería de la misma ciudad de Granada. Esto revela que o bien hay una fuente de infección común o este subtipo es el que se encuentra en la zona de Granada. Por ello, sería conveniente la investigación de los subtipos circulantes en esta zona, que colabore en el conocimiento de la distribución geográfica de los subtipos de *Cryptosporidium*.

Las secuencias del subtipo IaA11R2 que se han encontrado en las muestras pertenecientes al brote, presentaron una homología de entre 99.4% a 100% entre ellas (Goñi et al., 2014).

Comparación de las técnicas

En el presente trabajo se ha utilizado 4 técnicas diferentes para identificar los parásitos en las muestras de heces humanas. Dos de ellas: inmunocromatografía y microscopía son las técnicas habitualmente utilizadas para el diagnóstico previo y otras dos PCR SSU y PCR GP60 son técnicas de biología molecular, más avanzadas, que permiten detectar no solo la presencia de parásito en la muestra sino también el tipo y subtipo del parásito, lo que es muy importante para el estudio epidemiológico del género.

Si se compara la técnica de microscopía (con la tinción Zielh-Neelsen modificada) con las técnicas de la PCR para detectar el género *Cryptosporidium* spp. en las muestras, el resultado demuestra que las técnicas moleculares son mucho más fiables que la microscopía, ya que 42% de las muestras que dieron negativas por tinción luego resultaron ser positivas por las técnicas de la PCR. Sin embargo, aunque la fiabilidad de las técnicas de PCR es mayor hay que reconocer que requieren mucho más tiempo y dinero que las de tinción, por eso es difícil implantarlas en el diagnóstico diario en los laboratorios. Por otro lado son imprescindibles para el estudio epidemiológico de los parásitos.

Inmunocromatografía de *Giardia duodenalis*

El análisis de inmunocromatografía para *Giardia duodenalis*, de las muestras positivas para *Cryptosporidium*, dio como resultado 21 muestras positivas de las 80 totales, lo que supone el 26% de las muestras. La visión microscópica previa no habría detectado los quistes de *Giardia* debido a su bajo número, a su deterioro que los hace difíciles a reconocer o a la alta permanencia de la positividad en las técnicas más sensibles incluso cerca de un mes de resuelto la infección. En cualquier caso, estos resultados indican el contacto de los pacientes con *Giardia* y por lo tanto una posible co-infección. Dicha tasa sería del 76% (16) en Zaragoza y del 24% (5) en León. Es decir, una parte de la población se encuentra en contacto con las fuentes de infección para ambos parásitos que por otra parte, comparten también mecanismos de transmisión, lo que sugiere la necesidad de estudiar la posible existencia de portadores

sanos que faciliten la transmisión, y de profundizar en el conocimiento de las vías de transmisión más importantes en cada zona para el control de estas enfermedades.

GIARDIA DUODENALIS

tpi

Analizando las secuencias podemos observar que hay sustituciones que se repiten en muchas muestras en comparación a la muestra estándar 593. Estos son de T a C en las posiciones 9, 83 y 86 y de A a G en las posiciones 128 y 347.

Analizando las secuencias por pacientes podemos observar que las secuencias del paciente 9 (620, 621) son iguales entre ellas y a su vez iguales con las secuencias del paciente 21 (5, 5a). Por otro lado, por ejemplo, las secuencias del paciente 15 (178, 179) presentan identidad entre ellas pero son muy diferentes a la secuencia estándar 593 y muy parecidas a las secuencias con las que comparten las sustituciones, tales como 553, 566 y 233.

En cuanto al paciente 19 (en el cual ambas secuencias son del assemblage B) no se pudo poner las sustituciones en la tabla porque la homología entre las dos secuencias de este paciente (233 y 237) era de tan solo 80% lo que implica muchas sustituciones nucleotídicas puntuales. Esta situación ocurre porque una de las secuencias, la 233 comparte casi todas las sustituciones con las secuencias de homología 78% con la secuencia estándar mientras que la otra es casi igual a la secuencia estándar (homología 99,7%). Eso puede indicar genotipo mixto en el caso de este paciente.

β -giardina

Analizando las secuencias del gen de la *β -giardina* y tomando como estándar la secuencia 233 podemos observar que se repiten sustituciones de C a T en la posiciones 22 y 361, de A a G en la 49, 148, 216, 235 y 346, de C a T en la 55, 130, 196 y 409, de G a A en las posiciones 61, 73, 118, 277, 322 y 379, de T a C en las posiciones 178, 229, 238, 262, 280, 313 y 328 de G a T en la posición 202, de A a C en la posición 343 y de G a C en la posición 412. Podemos ver que por ejemplo las muestras del paciente numero 15 (178 y 179) son iguales entre ellas pero tienen cambios en común con otras muestras.

Analizando las secuencias por los pacientes podemos observar que algunas de ellas son iguales entre si, como las del paciente nr 15 o tienen dos de las tres secuencias iguales y una muy diferente, como se puede ver en el caso de paciente nr 21 donde las dos primeras secuencias 5 y 5a son iguales entre si y la última 5b tiene una homología de solo 92,9% con las otras en el trozo de 471 pb. Situación parecida podemos observar en el paciente nr 5 donde hay dos secuencias con una homología de solo 92,9% entre ellas en el trozo de 480 pb pero a su vez tienen mucha más homología con las secuencias de otros pacientes por tener sustituciones en común con ellas.

En cuanto a los pacientes 5 y 21 las secuencias tienen muchas sustituciones lo que puede dar de pensar que hay un genotipo mixto y por eso la secuencia de la *β -giardina* no sale bien.

Resumiendo los resultados de los pacientes teniendo en cuenta el análisis por los dos genes utilizados, se observa que hay 19 pacientes que tienen alguna muestra negativa por los dos métodos, 20 pacientes con alguna muestra negativa por el análisis del gen de la *tpi* y 23 pacientes con alguna muestra negativa con el análisis del gen de la *β-giardina*, dato que se puede deber al hecho que las PCR no siempre salen bien por las posibles variabilidades genéticas, poca eliminación de los quistes o bien por las interferencias en la PCR.

Muchos son los estudios que tienen como objeto el genotipado y caracterización de los aislamientos de *Giardia* que circulan tanto entre humanos como entre animales y también en el medio ambiente. Dicha caracterización va encaminada a la identificación de brotes como a una identificación de las vías de transmisión que permita su control y prevención. Otro aspecto importante sobre el que la caracterización de los aislamientos debe de arrojar luz es la identificación de cepas resistentes a los fármacos que se utilizan para el tratamiento de la giardiasis, permitiendo así diferenciar los aislamientos verdaderamente resistentes de los reinfecciones. Para ello, las técnicas moleculares basadas en la PCR suponen una herramienta indispensable. Varios han sido también los genes utilizados, siendo los más utilizados los que amplifican un fragmento del gen *tpi* y del gen de la *β-Giardina*. El problema fundamental que se plantea en la utilización de estas técnicas es el establecimiento de un criterio que define la relación entre los aislamientos de forma similar a los que existen para otros microorganismos.

De esta forma se plantea el estudio, tomando para su caracterización muestras seriadas de un mismo paciente con la premisa de que el aislamiento que provoca la infección debería ser el mismo en todas las muestras.

En el estudio de este gen *tpi* se obtuvieron 35 secuencias correspondientes a muestras de 23 pacientes, y de ellas se eliminaron 2 por no alcanzar la longitud deseada para el estudio. Además, para algunos (en concreto 12) pacientes solo se consiguió obtener la secuencia correspondiente a una sola muestra, con lo que el estudio comparativo solo se pudo realizar con las muestras correspondientes a 11 pacientes. Inicialmente todas ellas pertenecen al assemblage B, excepto dos de ellas correspondientes al mismo paciente que pertenecen al A, no habiendo encontrado ninguna mixta. El assemblage B es el que ha demostrado mayor variabilidad para el gen

tpi en estudios realizado anteriormente, mientras que ha destacado la baja variabilidad del A (Yang et al., 2010; Choy et al., 2015). De hecho, las muestras genotipo A presentaron un 100% de homología entre ellas. Considerando esto y que en el estudio solo las muestras de un paciente pertenecieron a este assemblage no se pueden sacar conclusiones que hagan referencia a un criterio para discernir individuos. No se han podido obtener más por la escasa prevalencia de este genotipo en nuestra área geográfica. En lo que respecta al assemblage B, hay que considerar varios datos clave:

- La homología entre todas las secuencias varía entre un 78% y un 100%, lo que podría en principio sugerir que es posible que se pueden establecer diferencias si las diferencias encontradas entre muestras de un mismo paciente son inferiores.
- Cuando las muestras de un mismo paciente se analizan paciente a paciente aparecen homologías que oscilan entre un 98% y un 100%, con un mínimo de 0 SNPs y un máximo de 10 si no se toman en cuenta el caso del Paciente 19.

La aplicación de técnicas estadísticas demuestra que estas diferencias son muy grandes, pudiendo llegar a superar el intervalo de confianza establecido cuando todas las secuencias se analizan en conjunto sugiriendo una gran variabilidad genética entre las *Giardia* excretadas por un mismo paciente en diferentes días, durante el tratamiento de la misma infección. Hay diversos factores que pueden influir en esto, como la posible reproducción sexual de *Giardia*, muy comentada pero hasta el momento no demostrada (Ramesh et al., 2005), la posibilidad de que una infección por *Giardia* rara vez sea producida por un único clon, y en esta ocasión, lo que se detectaría serían infecciones mixtas intra genotipo, quedando como clones aquellas con 0-1 sustituciones que son los que entran dentro del límite superior del intervalo de confianza. Y finalmente, existe la posibilidad de que al tratarse de un gen que codifica para una enzima metabólica, la variabilidad de dicha enzima fuera de la zona que supone su centro activo y lugares estratégicas de su estructura, sea muy alta y no permita la diferenciación entre individuos epidemiológicamente relacionados.

En el caso de la β -*Giardina*, solo se han podido analizar muestras correspondientes a 5 pacientes, encontrando en este caso 2 pacientes con infección por assemblage B, uno por A y 2 con infección mixta por assemblage A y B.

En este caso tomando las muestras con assemblage B, el grado de homología entre las de un mismo paciente es alto, pero es similar a la encontrada entre diferentes pacientes lo que sugiere que las diferencias no son suficientes para discernir individuos, aunque si permite diferenciar assemblages A y B.

Sí que llama poderosamente la atención que en el caso del Paciente 5, en que los dos aislamientos se habían identificado como assemblage B, al aplicar PCR para β -*Giardina*, se identifica una muestra con infección mixta por assemblage A y B. Esto reforzaría la hipótesis de infecciones causadas por mezclas de genotipos, que pueden ser A y B, pero también por diferentes A y diferentes B que la excreción de unos y otros no es continua, de forma que la PCR sólo detectaría es assemblage mayoritario en cada momento (Almeida et al., 2010). La caracterización molecular de *Giardia* se vería por tanto muy complicada ya que las técnicas que se utilizan verían limitada su posible aplicación mientras que la simple variación genética de los genes utilizados requeriría encontrar otros genes que poder aplicar.

CONCLUSIONES

1. En el periodo de tiempo estudiado, el mayor número de casos de cryptosporidiosis se dio en el año 2012 seguido por los años 2013 y 2009, y la mayor prevalencia se encontró en niños de entre 1 a 4 años (76% de casos estudiados).
2. Las especies de *Cryptosporidium* identificadas en este estudio fueron: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. ubiquitum* y *C. felis*, siendo *C. hominis* el predominante, lo que indica una mayor transmisión por contacto persona a persona. Así mismo, se describen los dos primeros casos de *C. ubiquitum* en humanos en España.
3. Se ha demostrado que la mayoría de las muestras de *C. parvum* procedían del medio urbano lo que sugiere la transmisión persona-persona más que transmisión zoonótica.
4. Dentro de todos los subtipos encontrados en este trabajo destaca el IbA10G2R2 que representa el 66% (67 pacientes) del total de los subtipos encontrados y es el único que se ve en todos los rangos de edad y en las dos provincias estudiadas, con identidad en el 72,7% de las secuencias analizadas, independientemente de su procedencia.
5. En este estudio se identifican los subtipos IaA11R2 y IfA13G1, IbA12G3R2 y IbA9G3R2, de *C. hominis* no descritos anteriormente en España y/o en otros países de Europa. Lo mismo ocurre con los subtipos de *C. parvum* IIaA17G2R1, IIaA18G3R1, IIaA19G2R1, IIaA13G2R1, IIdA20G1b, IIdA29G1, IIdA19G1, IIdA17G1 y el IIaA12G1R1, no descritos anteriormente en humanos en España.
6. Se ha demostrado que las diferencias entre los aislamientos del mismo assemblage de *Giardia* en muestras procedentes del mismo paciente y teóricamente idénticas, son similares a las que se encuentran cuando las muestras corresponden a diferentes pacientes, poniendo de evidencia que las infecciones por *Giardia* son habitualmente producidas por una mezcla de varios

genotipos pertenecientes a un mismo assemblage o que los métodos utilizados para la genotipificación no permiten su diferenciación.

BIBLIOGRAFÍA

Abal-Fabeiro JL, Maside X, Llovo J, Bartolomé C (2015) Aetiology and epidemiology of human cryptosporidiosis cases in Galicia (NW Spain), 2000-2008. *Epidemiol Infect* 20: 1-15.

Adam RD (1991) The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev* 55(4): 706-732.

Adam RD (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14(3): 447-475.

Adamu H, Petros B, Zhang G, Kassa H, Amer S, Ye J, Feng Y and Xiao L (2014). Distribution and Clinical Manifestations of *Cryptosporidium* Species and Subtypes in HIV/AIDS Patients in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* Apr 8(4): e2831.

Alcaraz Soriano MJ *Giardia y Giardiosis. Control Calidad SEIMC* 2002

Almeida A, Pozio E and Caccio SM (2010) Genotyping of *Giardia duodenalis* Cysts by New Real-Time PCR Assays for Detection of Mixed Infections in Human Samples. *Appl Environ Microbiol* 76(6): 1895-1901.

Alves M, Xiao L, Antunes F, Matos O. (2006) Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol Res* 99: 287-292.

Amar CFL, Dear PH, Pedraza-Díaz S, Looker N, Linnane E and McLauchlin J (2002) Sensitive PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Detection and Genotyping of *Giardia duodenalis* in Human Feces. *J Clin Microbiol* 40(2): 446-452.

Amer S, Honma H, Ikarashi M, Tada C, Fukuda Y, Suyama Y, Nakai Y (2010) *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in dairy calves in Egypt. *Vet Parasitol* 169: 382-386.

Amer S, Zidan S, Adamu H, Ye J, Roellig D, Xiao L and Feng Y. (2013) Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp in dairy cattle in Nile River delta provinces, Egypt. *Exp Parasitol* 135(3): 518-523.

Arieda J, Basterrechea M, Arriola L, Yagüe M, Albisua E, Arostegui N, Astigarraga U, Botello R (2012) Outbreak of cryptosporidiosis in a child day-care center in Gipuzkoa, Spain, October to December 2011. *Euro Surveill* 17(5): pii=20070.

Asociación de Médicos de Sanidad Exterior (AMSE) Información epidemiológica. Giardiasis. Epidemiología y situación mundial. (http://www.amse.es/index.php?option=com_content&view=article&id=204:giardiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&Itemid=50)

Asociación de Médicos de Sanidad Exterior Fecha de consulta: 15/10/2015. <http://www.amse.es>

Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J (2005) Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 43(12): 5940-5944.

Blanco MA, de Lucio A, Bailo B, Araque E, de Fuentes I and Carmena D (2015) *Cryptosporidium ubiquitum* in Venezuela. *GenBank* KP899827.

Buret AG (2008) Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite* 15: 261-265.

Caccio SM, DeGiacomo M, Pozio E (2002) Sequence analysis of the b-giardin gene and development of a polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human fecal samples. *Int J Parasitol* 32(2002): 1023-1030.

Calavier-Smith T (2003) Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *Europ J Protistol* 39: 338-348.

Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, Gilman RH, Xiao L (2008) *Cryptosporidium* Species and Subtypes and Clinical Manifestations in Children, Peru. *Emerg Infect Dis* 14(10): 1567-1574.

Cardona E, Castañeda S, Álvarez ME, Pérez JE, Rivera Páez FA, López Gartner GA (2014) Comparación de métodos convencionales y moleculares para la detección de *Giardia lamblia* en heces humanas. *Revista Luna Azul* 38: 159-170.

Cardona GA, Carabin H, Goñi P, Arriola L, Robinson G, Fernández-Crespo JC, Clavel A, Chalmers RM, Carmena D (2011) Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle population from the province of Álava, North of Spain. *Sci Total Environ* 412-413: 101-108.

Carmena D, Cardona GA, Sánchez-Serrano LP (2012) Current situation of *Giardia* infection in Spain: Implications for public health. *World J Clin Infect Dis* 2(1): 1-12.

Centers for Disease Control and Prevention Fecha de consulta: 10/04/2014
<http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>

Centers for Disease Control and Prevention Fecha de consulta: 27/10/2015
http://www.cdc.gov/parasites/crypto/health_professionals/tx.html

Chalmer RM and Katzer F (2013) Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitol* 29(5): 237-251.

Chalmers RM, Hadfield SJ, Jackson CJ, Elwin K, Xiao L and Hunter P (2008) Geographic Linkage and Variation in *Cryptosporidium hominis*. *Emerg Infect Dis* 14(3): 496-498.

Chalmers RM, Smith RP, Hadfield SJ, Elwin K and Giles M (2011) Zoonotic linkage and variation in *Cryptosporidium parvum* from patients in the United Kingdom. *Parasitol Res* 108: 1321-1325.

Choy SH, Mahdy MAK, Al Mekhlafi HM, Low VL and Surin J (2015) Population expansion and gene flow in *Giardia duodenalis* as revealed by triosephosphate isomerase gene. *Parasites&Vectors* 8: 454.

Cieloszyk J, Goñi P, García A, Remacha MA, Sánchez E, Clavel A (2012) Two cases of zoonotic criptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30(9): 549-551.

Clavel A, Arnal AC, Sánchez EC, Cuesta J, Letona S, Amiguet JA, Castillo FJ, Varea M, Gómez-Lus R (1996) Respiratory cryptosporidiosis: case series and review of the literature. *Infection* 24(5): 341-346.

Clavel A, Castillo FJ, Rubio MC, Gómez-Lus R (1990) Giardiosis. En: Cisterna JR, director. Plan de formación de enfermedades infecciosas: Infecciones gastrointestinales. Modulo V. Madrid. *Glaxo* p.123-130.

Clavel A, Doiz O, Morales S, Varea M, Seral C, Castillo FJ, Fleta J, Rubio C, Gómez-Lus R (2002) House fly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Cryptosporidium parvum*. *Folia Parasitol* 49(2): 163-164.

Compañ Barco MD, Llopis González A, Morales Suárez-Varela MM (1991) Consideraciones epidemiológicas sobre criptosporidiosis. *Rev San Hig Púb* 65: 363-370.

Couto MC, Lima MD and Bomfim TC (2013) New *Cryptosporidium parvum* subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. *Acta Trop* 130C: 117-122.

Del Coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA (2009) Cryptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev Argent Microbiol* 41(3): 185-196.

Desai NT, Sarkar R and Kang G (2012) Cryptosporidiosis: An under-recognized public health problem. *Trop Parasitol* 2(2): 91-98.

Deshpande A, Alexander CL, Coyne M, Brownlie S, Smith-Palmer A, Jones BL (2014) Molecular diversity of Scottish *Cryptosporidium hominis* isolates. *Epidemiol Infect* 4: 1-6.

Dobell C. (1920). The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proc. R. Soc. Med.* 13: 1-15.

Dra. Alina Llop Hernandez (2001) Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo III. Sección VI. Parasitos. Capítulo 91. *Cryptosporidium*.

Dra. Alina Llop Hernandez (2001) Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo III. Sección VI. Parasitos. Capítulo 78. *Giardia Lamblia*.

Durigan M, Abreu AG, Zucchi MI, Bueno Franco RM, Pereira de Souza A (2014) Genetic Diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus Genotyping Reveals Zoonotic Potential between Clinical and Environmental Sources in a Metropolitan Region of Brazil. *PLoS ONE* 9(12): 1-27.

Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM (2003) The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int Journ Parasitol* 33: 3-28.

Fayer R, Santín M, Macarisin D (2010) *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet Parasitol* 172: 23-32.

Feltus DC, Giddings CW, Schneck BL, Monson T, Warshauer D and McEvoy JM (2006) Evidence Supporting Zoonotic Transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journ Clin Microbiol* 44(12): 4303-4308.

Feng Y and Xiao L (2011) Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 24(1): 110-140.

Feng Y, Lal AA, Li N, Xiao L (2011) Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Exp Parasitol* 127: 238-242.

Feng Y, Li N, Duan L, Xiao L (2009). *Cryptosporidium* Genotype and Subtype Distribution in Raw Wastewater in Shanghai, China: Evidence for Possible Unique *Cryptosporidium hominis* Transmission. *J Clin Microbiol* 47(1): 153-157.

Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M., Zhang X, Fayer R, Gatei W, Cama V and Xiao L (2007) Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet Parasitol* 144: 1-9.

Feng Y, Tiao N, Li N, Hlavsa M, Xiao L (2013). Multilocus Sequence Typing of an Emerging *Cryptosporidium hominis* Subtype in the United States. *J Clin Microbiol* 52(2): 524-530.

Follet J, Guyot K, Leruste H, Follet-Dumoulin A, Hammouna-Ghelboun O, Cdertad G, Dei-Cas E and Halama P (2011) *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France: molecular characterization of species in a longitudinal study. *Vet Research* 42:16.

Foronda P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, Periago MV, Valero MA, Valladares B, Mas-Coma S (2008) Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitos Res* 103: 1177-1181.

Fuentes I, Martín C, Beristain X, Mazón A, Saugar JM, Blanco A, García Cenoz M, Valle-Cristia M, Ezpeleta C, Castilla J (2014) *Cryptosporidium hominis* genotypes involved in increased and clusters of cases, Navarra, Spain, 2012. *Epidemiol Infect* 14: 1-4.

Galván AL, Magnet A, Izquierdo F, Fernández Vadillo C, Peralta RH, Angulo S, Fenoy S, del Aguila C (2014) A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. *Sci Total Environ* 468-469: 368-375.

Geurden T, Berkvens D, Martens C, Casaert S, Vercruysse J and Claerebout E (2007) Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitol* 134(Pt.14): 1981-1987.

Ghaffari S, Kalantari N (2014) A Multi-Locus Study of *Cryptosporidium* Parasites Isolated From Patients Living In Iran, Malawi, Nigeria, the United Kingdom, and Vietnam. *Iranian J Parasitol* 9(1): 79-89.

Glaberman S, Moore JE, Lowery CJ, Chalmers RM, Sulaiman I, Elwin K, Rooney PJ, Millar BC, Dooley JSG, Lal AA and Xiao L (2002) Three Drinking-Water-Associated Cryptosporidiosis Outbreaks, Northern Ireland. *Emerg Infect Dis* 8(6): 631-633.

Goñi P, Aldana DE, Clavel A, Seral C, Remacha MA y Castillo FJ (2010) Prevalencia de *Giardia duodenalis* genotipo B en humanos en Zaragoza y León, España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20(10): 710-712.

Goñi P, Almagro-Nievas D, Cieloszyk J, Lobez S, Navarro-Marí JM, Gutierrez-Fernandez J (2015) Cryptosporidiosis outbreak in child day-care center caused by an unusual *Cryptosporidium hominis* subtype. *Enferm Infecc Microbiol Clin* doi: 10.1016/j.eimc.2015.02.003

Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K and Chalmers RM (2011) Detection and Differentiation of *Cryptosporidium* spp. in Human Clinical Samples by Use of Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 49(3): 918-924.

Helmy YA, Krucken J, Nockler K, von Samson-Himmelstjerna G and Zessin KH (2013) Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia Province of Egypt. *Vet Parasitol* 193(1-3): 15-24.

Hijjawi N, Ng J, Yang R, Atoum MFM, Ryan U (2010) Identification of a rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in human isolates from Jordan. *Exp Parasitol* 125: 161-164.

Hira KG, Mackay MR, Hempstead AD, Sabeena A, Karim MM, O'Connor RM, Hibberd PL, Calderwood SB, Ryan ET, Khan WA, Ward HD (2011) Genetic Diversity of *Cryptosporidium* spp. from Bangladeshi Children. *Journ Clin Microbiol* 49(6): 2307-2310.

Hlvasa MC, Roberts VA, Kahler AM, Hilborn ED, Mecher TR, Beach MJ, Wade TJ, Yoder JS (2015) Outbreaks of Illness Associated with Recreational Water – United States, 2011-2012. *Weekly* 64(24): 668-672.

Hoepelman AIE (1996) Current therapeutic approaches to cryptosporidiosis in immunocompromised patients. *Journ Antimicrob Chemother.* 37: 871-880.

Imre K, Luca C, Costache M, Sala C, Morar A, Morariu S, Ilie MS, Imre M and Darabus G (2013) Zoonotic *Cryptosporidium parvum* in Romanian newborn lambs (*Ovis aries*). *Vet Parasitol* 191(1-2): 119-122.

Instituto de Salud Pública de Chile Fecha de consulta: 20/11/2014
http://www.ispch.cl/lab_sal/parasitologia/control_subpro.html

Iqbal A, Lim YAL, Surin J and Sim BLH (2012) High Diversity of *Cryptosporidium* Subgenotypes Identified in Malaysian HIV/AIDS Individuals Targeting gp60 Dene. *PLoS One* 7(2): e31139.

Iseki M (1979) *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jap J Parasitol* 28: 285-307.

Jerlström-Hultqvist J, Ankarlev J and Svärd SG (2010) Is human giardiasis caused by two different *Giardia* species? *Gut Microbes* 1(6): 379-382.

Jex AR, Gasser RB (2008) Analysis of the genetic diversity within *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis by mutation scanning. *Electrophoresis* 29: 4119-4129.

Jex AR, Gasser RB (2010) Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies – Research review. *Biotech Adv* 28: 17-26.

Jex AR, Pangasa A, Campbell BE, Whipp M, Hogg G, Sinclair AI, Stevens M, Gasser RB (2008) Classification of *Cryptosporidium* Species from Patients with Sporadic Cryptosporidiosis by Use of Sequence-Based Multilocus Analysis following Mutation Scanning. *Jurn Clin Microbiol* 46(7): 2252-2262.

Jex AR, Pangasa A, Campbell BE, Whipp M, Hogg G, Sinclair MI, Stevens M and Gasser RB (2008) Classification of *Cryptosporidium* Species from Patients with Sporadic Cryptosporidiosis by Use of Sequence-Based Multilocus Analysis following Mutation Scanning. *Journ Clin Microbiol* 46(7): 2252-2262.

Koehler AV, Bradbury RS, Stevens MA, Haydon SR, Jex AR, Gasser RB (2013) Genetic characterization of selected parasites from people with histories of gastrointestinal disorders using a mutation scanning-coupled approach. *Electrophoresis* 34(12): 1720-1728.

Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omere R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM (2013) Burden and aetiology of diarrheal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382(9888): 209-222.

Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Caccio SM (2005) Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 35(2): 207-213.

Li N, Xiao L, Alderisio K, Elwin K, Cebelinski E, Chalmers R, Santin M, Fayer R, Kvac M, Ryan U, Sak B, Stanko M, Guo Y, Wang L, Zhang L, Cai J, Roeling D and Feng Y (2014) Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum* a Zoonotic Pathogen Emerging in Humans. *Emerg Infect Dis* 20(2): 217-224.

Lim YAL, Iqbal A, Surin J, Sim BLH, Jex AR, Nolan MJ, Smith HV, Gasser RB (2011) First genetic classification of *Cryptosporidium* and *Giardia* from HIV/AIDS patients in Malaysia. *Inf, Genet Evaluat*. 11: 968-974.

Llorente MT, Clavel A, Goñi MP, Varea M, Seral C, Becerril R, Suarez L, Gómez-Lus R (2007) Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitol Int* 56: 201-205.

Llorente MT, Clavel A, Varea M, Goñi MP, Sahagún J, Olivera S (2006) *Cryptosporidium felis* infection, Spain. *Emerg Infect Dis* 12(9): 1471-1472.

Lobo ML, Xiao L, Antunes F and Matos O (2009) Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Lett Appl Microbiol* 48(6): 732-737.

Mac Kenzie WR, Schell WL., Blair KA, Addiss DG, Peterson DE, Hoxie N J, Kazmierczak JJ, Davis JP (1995) Massive Outbreak of Waterborne *Cryptosporidium* Infection in Milwaukee, Wisconsin: Recurrence of Illness and Risk of Secondary Transmission. *Clin Infect Dis* 21(1): 57-62.

Martín Andrés A, Juan de Dios Luna del Castillo (2004) Bioestadística para las ciencias de la salud (+) 1º Ed. Madrid: Capitel Ediciones; pp: 136-139.

Martín-Ampudia M, Mariscal A, Lopez-Gigosos RM, Mora L, Fernandez-Crehuet J (2012) Under-notification of cryptosporidiosis by routine clinical and laboratory practices among non-hospitalized children with acute diarrhea in Southern Spain. *Infection* 40(2): 113-119.

Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE (1976) Overwhelming watery diarrhea associated with a cryptosporidium in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70(6): 1156-1160.

Mi R, Wang X, Li Ch, Huang Y, Zhou P, Li Z, Lei M, Cai J and Chen Z (2013) Prevalence and Genetic Characterization of *Cryptosporidium* in Yaks in Qinghai Province of China. *PLoS One* 8(9): e74985.

Minetti C, Lamden K, Durband C, Cheesbrough J, Fox A and Wastling JM (2015) Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. *Parasites & Vectors* 8: 444

Molina N, Polverino D, Minvielle M, Basualdo J (2007) PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixes feces. *Rev Latinoam Microbiol* 49(1-2): 6-11.

Molloy SF, Smith HV, Kirwan P, Nichols RAB, Asaolu SO, Connelly L and Holland CV (2010) Identification of High Diversity of *Cryptosporidium* Species Genotypes and Subtypes in a Pediatric Population in Nigeria. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 82(4): 608-613.

Monis PT, Caccio SM, Thompson RCA (2009) Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitol* 25(2): 93-100.

Navarro i Martínez L, del Águila C and Bornay-Llinares FJ. (2011) *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29(2): 135-143.

Navarro-I-Martínez L, da Silva AJ, Llovo Taboada J, Del Águila C, Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ (2013) Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated in humans in two different locations in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 31(8): 506-510.

Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA and Yardley JH (1976). Acute enterocolitis in human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70(4): 592-598.

Nolan MJ, Jex AR, Koehler AV, Haydon SR, Melita AS and Gasser RB (2013) Molecular-based investigation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from animals in water catchments in southeastern Australia. *Water Research* 47(5): 1726-1740.

O'Donoghue P (1995) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. *Int J of Inf Parasitol* 25(2): 139-195.

Olivares JL, Fernández R, Fleta J, Ruiz MY, Clavel A (2002) Vitamin B12 and folic acid in children with intestinal parasitic infection. *J Am Coll Nutr* 21(2): 109-113.

Ong CSLO, Eisler DL, Alikhani A, Fung VWK, Tomblin J, Bowie WR and Isaac-Renton JL (2002) Novel *Cryptosporidium* Genotypes in Sporadic Cryptosporidiosis Cases: First Report of Human Infections with a Cervine Genotype. *Emerg Infect Dis* 8(3): 263-268.

Pangasa A, Jex AR, Nolan MJ, Campbell BE, Haydon SR, Stevens MA and Gasser RB (2010) Highly sensitive non-isotopic restriction endonuclease fingerprinting of nucleotide variability in the gp60 gene within *Cryptosporidium* species, genotypes and

subgenotypes infective to humans, and its implications. *Electrophoresis* 31(10): 1637-1647.

Perez BS (2010) *Cryptosporidium* y *Toxoplasma*. Dos importantes protozoos parásitos transmisibles por los alimentos y el agua. *Académico Numerario de la Real Academia Nacional de Farmacia* p. 219-301.

Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ, Slemenda SB, da Silva AJ, Moura INS, Arrowood MJ, Ditrich O and Addiss DG (1999) New *Cryptosporidium* Genotypes in HIV-Infected Persons. *Emerg Infect Dis* 5(3): 444-449.

Plutzer J, Ongerth J, Karanis P (2010) *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int J of Hyg and Environ Health* 213(5): 321-333.

Power ML, Cheung-Kwok-Sang C, Slade M, Williamson S (2009) *Cryptosporidium fayeri*: Diversity within the GP60 locus of isolates from different marsupial hosts. *Exp Parasitol* 121: 219-223.

Pozio E., Morales M. A. (2005) The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends Parasitol* 21(2): 58-63.

Quilez J, Torres E, Chalmers RM, Robinson G, del Cacho E and Sanchez-Acedo C (2008) *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. *Parasitol* 135: 1613-1620.

Quilez J, Vergara-Castiblanco C, Monteagudo L, del Cacho E, Sánchez-Acedo C (2013) Host Association of *Cryptosporidium parvum* Population Infecting Domestic Ruminants in Spain. *Appl Environ Microbiol* 79(17): 5363-5371.

Rajurkar MN, Lall N, Basak S, Mallick SK (2012) A Simple Method for Demonstrating the *Giardia Lamblia* Trophozoite. *J Clin Diagn Res* 6(9): 1492-1494.

Ramesh MA, Malik SB, Logsdon Jr. JM (2005) A Phylogenomic Inventory of Meiotic Genes: Evidence for Sex in *Giardia* and an Early Eukaryotic Origin of Meiosis. *Current Biology* 15: 185-191.

Ramo A, Quilez J, Vergara-Castiblanco C, Monteagudo L, Del Cacho E, Clavel A (2015) Multilocus typing population structure of *Cryptosporidium* from children in Zaragoza, Spain. *Infect Genet Evol* 31C: 190-197.

Rendtorff RC (1954) the experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia Lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg* 59(2): 209-220.

Requena-Méndez A, Goñi P, Lóbez S, Oliveira I, Aldasoro E, Valls ME, Clavel A, Gascón J and Muñoz J (2014) A family cluster of giardiasis with variable treatment responses: refractory giardiasis in a family after a trip to India. *Clin Microbiol Infect* 20: 135-138.

Rieux A, Chatier C, Pors I, Delafosse A and Paraud C (2013) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from high-excreting young dairy calves in dairy cattle herds in Western France. *Parasitol Res* 112: 3423-3231.

Ryan U, Hijjawi N (2015) New developments in *Cryptosporidium* research. *Int J Parasitol* 45: 367-373.

Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, Capilla S, Arias A, Gomez-Lus R (2008) Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27(1): 81-83.

Segura R, Prim N, Montemayor M, Valls ME, Muñoz C (2015) Predominant Virulent IbA10G2 Subtype of *Cryptosporidium hominis* in Human Isolates in Barcelona: A Five-Year Study. *PLoS One* 10(3): e0121753.

Sharma P, Sharma A, Sehgal R, Malla N and Khurana S. (2013) Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *Int J of Inf Disease* 17: 601-605.

Shrestha RD, Grinberg A, Dukkipati VS, Pleydell EJ, Prattley DJ and French NP. (2014) Infections with multiple *Cryptosporidium* species and new genetic variants in young dairy calves on a farm located within a drinking water catchment area in New Zealand. *Vet Parasitol* 202(3-4): 287-291.

Soba B, Logar J (2008) Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology* 135(11): 1263-1270.

Soba B, Petrovec M, Mioc Vand Logar J (2006) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *CMI* 12: 918-940.

Soriano MJA (2002) *Giardia* y Giardiasis CCS p. 1-9.

Strong WB., Gut J. and Nelson RG (2000) Cloning and Sequence Analysis of a Highly Polymorphic *Cryptosporidium parvum* Gene Encoding a 60-Kilodalton Glycoprotein and Characterization of Its 15- and 45-Kilodalton Zoite Surface Antigen Products. *Infect Immun* 68(7): 4117-4134.

Su Yin Ng J, Eastwood K, Walker B, Durrhein DN, Massey PD, Porigneaux P, Kemp R, McKinnon B, Laurie K, Miller D, Bramley E and Ryan U (2012) Evidence of *Cryptosporidium* transmission between cattle and humans in northern New South Wales. *Exp Parasitol* 130(4): 437-441.

Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA and Xiao L (2003) Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis* 9(11): 1444-1452.

Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Aa-Shelahi FA, Shweiki HM, Iqbal J, Khalid N, Xiao L (2005) Unique Endemicity of *Cryptosporidium* in Children in Kuwait. *Journ Clin Microbiol* 43(6): 2805-2809.

Szostakowska B, Kruminis-Lozowska W, Racewicz M, Knight R, Tamang L, Myjak P and Graczyk TK (2004). *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* recovered from flies on a cattle farm and in a landfill. *Appl and Environ Microbiol* 70(6): 3742-3744.

Tamer GS, Kasap M, Er DK (2015) Genotyping and Phylogenetic Analysis of *Giardia duodenalis* Isolates from Turkish Children. *Med Sci Monit* 21: 526-532.

Thompson RCA (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol* 126: 15-35.

Torres-Romero JC, Euan-Canto AJ, Benito-González N, Padilla-Montaña N, Huchin-Chan C, Lara-Riegos J, Cedillo-Rivera R (2014) Intestinal parasites and genotyping of *Giardia duodenalis* in children: first report of genotype B in isolates from human clinical samples in Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 109(3): 388-390.

Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, Martin SW, Nydam DV, Jamieson F, Xiao L. (2006) Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitol Res* 99: 346-352.

Valenzuela O, González-Díaz M, Garibay-Escobar A, Burgara-Estrella A, Cano M, Durazo M, Bernal RM, Hernandez J and Xiao L. (2014) Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Children from Mexico. *PLoS One* 9(4): e96128.

Vega Gutiérrez ML, Alfaro González M, Triguez García M, Calvo Romero C. (2008) Giardiasis resistente a metronidazol: a propósito de un caso. *Rev Pediatr Aten Primaria* 10: 261-266.

Viajar Seguro Fecha de consulta: 10/09/2015 <http://www.viajarseguro.org/>

Waldron L, Dimeski B, Beggs PL, Ferrari BC, Power ML. (2011) Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. *Appl Environ Microbiol* 77(21): 7757-7765.

Waldron LS, Dimeski B, Beggs PJ, Ferrari BC, Power ML (2011) Sporadic human cryptosporidiosis, Australia: Molecular epidemiology, spatio – temporal analysis and ecology. *Appl Environ Microbiol* 77: 7757-7765.

Waldron LS, Ferrari BC, Power ML (2009) Glycoprotein 60 diversity in *C. hominis* y *C. parvum* causing human cryptosporidiosis in NSW, Australia. *Exp Parasitol* 122: 124-127.

Wang Z, Zhang H, Zhao X, Zhang L, Zhang G, Guo M, Liu L, Feng Y and Xiao L (2013) Zoonotic *Cryptosporidium* Species and *Enterocytozoon bieneusi* Genotypes in HIV-Positive Patients on Antiretroviral Therapy. *Journ Clin Microbiol* 51(2): 557-563.

Wielinga PR, de Vries A, van der Goot TH, Mank T, Mars MH, Kortbeek LM, van der Giessen JWB (2008) Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int J Parasitol* 38: 809-817.

World Health Organization Fecha de consulta: 10/06/2015 <http://www.who.int>

Xiao L (2010) Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experin Parasitol* 124: 80-89.

Xiao L, Escalante L, Yang Ch, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ., Fayer R and LAL AA (1999) Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* Parasites Based on the Small-Subunit rRNA Gene Locus. *Appl Environ Microbiol* 65(4): 1578-1583.

Yang R, Lee J, Ng J, Ryan U (2010) High prevalence *Giardia duodenalis* assemblage B and potentially zoonotic subtypes in sporadic human cases in Western Australia. *Int J Parasitol* 40: 293-297.

Yin J, Liu L, Yuan Z, Shen Y and Cao J (2012) The identification of *Cryptosporidium* spp. in humans in Shangai, China. *GenBank* JN833576.

Zhang W, Wang R, Yang F, Zhang L, Cao, Zhang X, Ling H, Liu A and Shen Y (2013). Distribution and Genetic Characterizations of *Cryptosporidium* spp in Pre-Weaned Dairy Calves in Northeastern China's Heilongjiang Province. *PLoS One* 8(1): e54857.

Zintl A, Ezzaty-Mirashemi M, Chalmers RM, Elwin K, Mulcahy G, Lucy FE and Waal DE (2011) Longitudinal and spatial distribution of GP60 subtypes in human cryptosporidiosis cases in Ireland. *Epidem and Inf* 139(12): 1945-1955.

PUBLICACIONES

Y

COMUNICACIONES A CONGRESOS

PREVALENCIA DE ESPECIES DE *CRYPTOSPORIDIUM* EN POBLACIÓN INFANTIL EN LEÓN (ESPAÑA)

¹Joanna Cieloszyk, ^{1,2}P. Goñi, ³MA Remacha, ^{1,2}A. Clavel

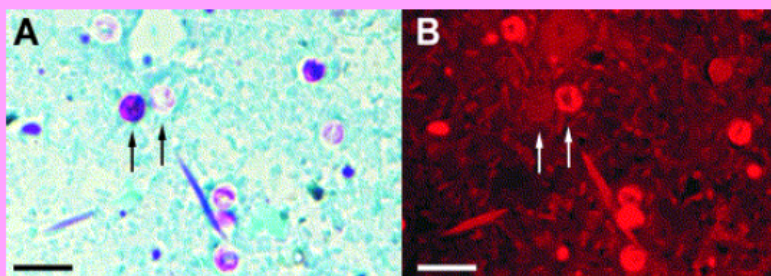
¹ Área de Parasitología. Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.

² Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS).

³ Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital de León, León, España.

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium spp es un protozoo que causa diarrea en humanos y animales. La transmisión es de persona-persona (feco-oral) o por consumo de agua y/o alimentos contaminados. Es uno de los protozoos más frecuentemente relacionado con trastornos gastrointestinales, sobre todo en niños.



Ooquistes de *Cryptosporidium* spp con la tinción Ziehl-Neelsen modificada vistas: A - en microscopio óptico a 100x y B - el mismo campo con microscopía epifluorescente.

OBJETIVO

Presentar los resultados preliminares de los genotipos de *Cryptosporidium* circulantes en la provincia de León.

RESULTADOS

El 15% de los pacientes pertenecían al ámbito rural y el 85% restante al urbano. De las muestras estudiadas 38 resultaron positivas. Las especies identificadas fueron: *C. hominis* en 24(60%) de los casos, *C. parvum* en 13(32,5%) y *C. ubiquitum* (Genotipo cervino) en 1 caso. Esta última muestra correspondió a un niño del ámbito rural, que tenía contacto con ganado ovino y presentó dolor abdominal.

CONCLUSIONES

No se encontró asociación estadísticamente significativa, entre especie y ámbito al que correspondían los pacientes, ya que el 87.5% y el 84.5% de *C. hominis* y *C. parvum* respectivamente, se aislaron en pacientes del entorno urbano. Los 14 pacientes de los que se conoce que presentaron diarrea, se distribuyeron de igual manera entre *C. hominis* (42.9%) y *parvum* (57.1%). Sólo se pudo encontrar asociación estacional para las especies cuando los meses se agruparon en cuatrimestres ($p < 0.05$), de forma que *C. hominis* se detectó mayoritariamente en el último cuatrimestre del año, coincidiendo con la vuelta de los niños a guarderías y colegios. *C. parvum* predominó en los otros dos cuatrimestres. (Figura 1). En este trabajo se describe por primera vez *C. ubiquitum* en humanos en España.

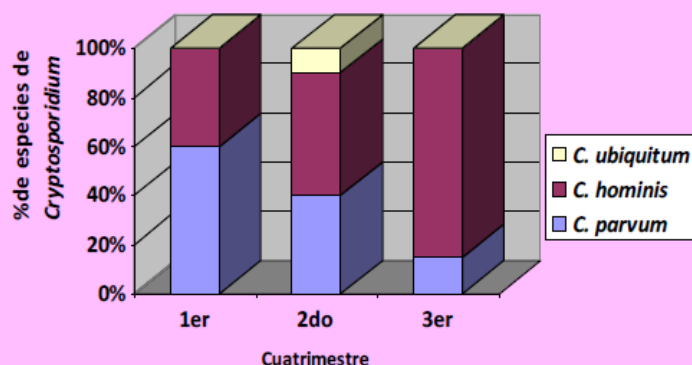
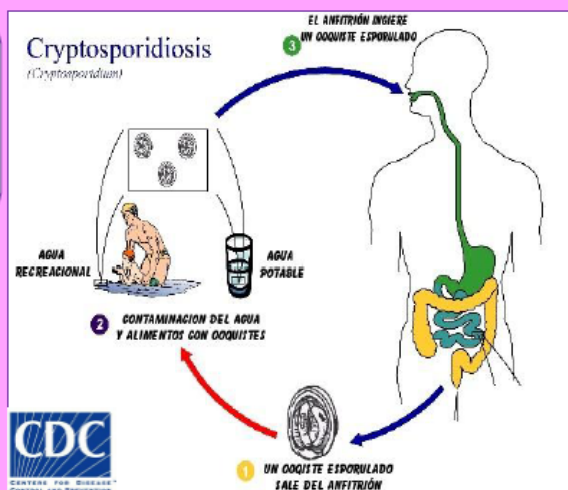


Figura 1



Circulación de *Cryptosporidium* spp.

MATERIALES Y METODOS

Cuarenta muestras, procedentes de niños entre 0 y 8 años, aisladas entre los años 2008-2011, se sometieron a la tinción Ziehl Neelsen (para comprobar si tienen oocistos) y a PCR para amplificar un fragmento del gen *SSUrDNA* y posterior RFLP con *SspI* y *VspI*.



Patrones RFLP obtenidos:

- 1-marcador λ Pst;
- 2-*C. ubiquitum* (SspI);
- 3-*C. parvum* (SspI);
- 4-*C. hominis* (SspI);
- 5-*C. ubiquitum* (VspI);
- 6-*C. parvum* (VspI);
- 7-*C. hominis* (VspI).

BIBLIOGRAFÍA:

- Varea M. et al. (1998) Fuchsin fluorescence and autofluorescence in *Cryptosporidium*, *Isospora* and *Cyclospora* oocysts. *Intern Journ for Parasitol* 28(12), 1881-3.
- http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/A-F/Cryptosporidiosis/body_Cryptosporidiosis_page1.htm#LifeCycle



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Brief report

Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*

Joanna Cieloszyk^a, Pilar Goñi^{a,*}, Alicia García^a, María A. Remacha^b, Elena Sánchez^c, Antonio Clavel^a

^a Area of Parasitology, Department of Microbiology, Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Spain

^b Laboratory of Microbiology and Parasitology, Health Care University Complex of León, León, Spain

^c Laboratory of Microbiology and Parasitology, Hospital Lozano Blesa, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2012

Accepted 9 April 2012

Available online 23 June 2012

Keywords:

Cryptosporidium ubiquitum

Cryptosporidium felis

Zoonotic transmission

Spain

ABSTRACT

Introduction: Two cases of infection by zoonotic transmission of unusual species of *Cryptosporidium* were detected in 2010–2011 in Spain (León and Zaragoza).

Materials and methods: *Cryptosporidium* spp. was detected by microscopic examination of modified Ziehl–Neelsen stained fecal smears. PCR-RFLP of the *SSUrDNA* gene and sequencing of the amplified fragment confirmed the species.

Results: *C. ubiquitum* and *C. felis* were identified in samples from an immunocompetent child and from a HIV-positive adult, respectively.

Conclusions: This is the first report of human infection by *C. ubiquitum* (cervine) and autochthonous *C. felis*, identified in Spain.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Dos casos de criptosporidiosis zoonótica en España por las especies inusuales *Cryptosporidium ubiquitum* y *Cryptosporidium felis*

RESUMEN

Introducción: Se describen dos casos de infección por especies inusuales de *Cryptosporidium* de transmisión zoonótica detectados en España (León y Zaragoza) en 2010 y 2011.

Material y métodos: *Cryptosporidium* se detectó por tinción Ziehl–Neelsen modificada de la concentración de heces. Las especies se determinaron por PCR-RFLP del gen *SSUrDNA* y se confirmaron por secuenciación del fragmento amplificado.

Resultados: *C. ubiquitum* y *C. felis* fueron identificados en muestras procedentes de un niño inmunocompetente y un adulto VIH-positivo respectivamente.

Conclusiones: Este estudio es la primera comunicación de infecciones humanas por *C. ubiquitum* (cervine) y de *Cryptosporidium felis* de origen autóctono identificados en España.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Palabras clave:

Cryptosporidium ubiquitum

Cryptosporidium felis

Transmisión zoonótica

España

Introduction

Cryptosporidium spp. (Protozoa, Apicomplexa) is a protozoa associated with gastrointestinal disorders in humans and animals. It is a worldwide distributed parasite which has many hosts, including humans and domestic animals. It has been found in both immunocompetent and immunosuppressed patients.

Cryptosporidium hominis and *Cryptosporidium parvum* are responsible for 90% of human cryptosporidiosis in the world. *C. parvum* are relevant in humans and animals. However,

Cryptosporidium meleagridis, *Cryptosporidium cuniculus*, *Cryptosporidium muris*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium andersoni* and *Cryptosporidium ubiquitum* (Cervine genotype) can also infect humans, especially children and immunosuppressed patients.^{1–4} Cervine genotype, later called *C. ubiquitum* because of the wide range of hosts and geographical areas, was found in several species of mammals (domestic and wild).¹ As far as we know, *C. ubiquitum* has been described in a few cases in human patients worldwide. It was first reported by Ong et al. in Canada in 2002.⁵ It was later confirmed by several studies that *C. ubiquitum* can infect humans.

The cat is the main host of the *C. felis* genotype. It was first found in domestic cat in 1979 by Iseki.⁶ Later it was also found

* Corresponding author.

E-mail address: pgoni@unizar.es (P. Goñi).

in cattle and then in humans.⁷ The first report of *C. felis* in humans was published by Pieniazek et al. in 1999.⁸ They described three cases of *C. felis* in immunosuppressed patients. Later several studies confirmed that this genotype can infect both immunocompetent and immunosuppressed patients. *C. felis* was first described in humans in Spain by Llorente et al. in 2006 in an adopted immunocompetent 4-year-old boy who acquired the infection in Calcutta (India).⁹

The aim of the present article is to report two cases of zoonotic transmission of non-*parvum* *Cryptosporidium* which have occurred in recent years in Spain.

Methods

Stool samples were collected from the patients in León (Spain) in May 2010 and in Zaragoza (Spain), in July 2011. Both samples were sent to the Parasitology Laboratory of the Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Spain.

In both cases the stool samples were concentrated with formalin–ethyl acetate. Smears from the two concentrated samples were stained with a modified Ziehl–Neelsen stain and examined by means of microscopy to detect *Cryptosporidium* oocysts. DNA was extracted using a DNA stool kit (IBIAN® DNA Stool Kit) and following the manufacturer's instructions. The samples were stored at –20°C until their processing.

A fragment of the 18S rRNA subunit (SSU rRNA) was amplified by nested PCR following previously described protocols.¹⁰ In order to identify the species of *Cryptosporidium*, PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis was performed with the products of the secondary PCR, which were digested with *SspI* and *VspI* enzymes at 37°C overnight.

Additionally, PCR products of the 18S rRNA gene fragments were purified with GFX™ PCR DNA Gel Band Purification Kit and direct sequenced. The nucleotide sequences obtained were analyzed and compared with those registered in GenBank using Chromas and BioEdit.

Results

In the first case, the patient was a 6-year-old boy from a rural area who came to the University Health Care Complex of León with an abdominal pain. Although the child lived in the urban area of León, he spent a lot of time in the village with his grandparents who bred sheep, and contact with these animals was confirmed by the child's family.

The RFLP analysis of an amplicon of 826–864-bp, showed a band profile consistent with *C. ubiquitum* patterns: 454, 384-bp with *SspI* digestion and 461, 169, 115-bp with *VspI* digestion, and the sequence showed 99% similarity with the fragment of the various *C. ubiquitum* sequences (accession no. HM209375.1, HQ822139.1, among others).

The second patient was a 49-year-old, HIV-positive man, also from rural area, who came to a hospital in Zaragoza with diarrhea of 1-month onset, weight loss, dysphagia, sporadic fever, and generally feeling unwell. He was diagnosed with esophageal candidiasis. *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis hominis* were identified in this patient's fecal sample.

In this case, the RFLP analysis of the expected amplicon showed a band profile consistent with *C. felis* patterns: 426, 390-bp with *SspI* digestion and 476, 182, 104-bp with *VspI* digestion. The sequence of this fragment has maximum similarity with various *C. felis* sequences (95%, accession numbers AF356786.1, GU944848.1, among others).

The sequences of *C. ubiquitum* and *C. felis* identified in this work were registered in GenBank under accession numbers JN642225 and JQ312664, respectively.

Discussion

There are a few published studies characterizing human cryptosporidiosis in Spain. In them, molecular studies showed that there were 4 species which are the most important in human epidemiology: *C. parvum* and *C. hominis* are the most frequently found, followed by *C. meleagridis*, and *C. felis* is the least frequent.^{3,11}

Publications up until now show that *C. ubiquitum* has been found in humans only in: New Zealand, Slovenia, Wisconsin, Ontario, Canada, British Columbia, Ohio and the United Kingdom.¹ On the other hand, *C. felis* infection in humans has been reported in several countries, including one case in Spain in a child adopted from an Indian orphanage.⁹ As far as we know, and unlike the previous case, this report is the first autochthonous case of *C. felis* in Spain. The transmission route for the unusual *Cryptosporidium* species to humans is unclear, but *C. ubiquitum* has been previously found in lambs in Galicia (NW Spain), a geographical area near León,¹² where 5 isolates from 2 farms were identical to the *Cryptosporidium* cervine genotype 1 sequence AF442484. In this study, the sequence of PCR product of the SSU rRNA locus showed 99% identity with GenBank AF442484 of cervine genotype 1 with a single nucleotide transition at position 766 (nucleotide A was substituted for nucleotide G). In this case, the close contact between the child and animals could favor zoonotic transmission, even in the case of an immunocompetent host. Furthermore, after 15 days without contact with sheep the symptomatology of the child improved, no signs of *Cryptosporidium* were observed either in the parasitological study of the fecal samples or in the molecular study. Some authors have suggested that *C. ubiquitum* could emerge as an important human pathogen, but, until now, it has been reported only occasionally in humans. The lack of host specificity of *C. ubiquitum* and the habitat-sharing of its hosts probably contribute to it being widespread.¹ In the case of *C. felis*, the sequence obtained had only 95% homology with the one previously published, which was similar to the AF112575.1 sequence. This difference may be justified by the geographical distance between the two isolates. On the other hand, contamination with *C. felis* might favor patient co-infection with HIV and the rural place of residence. In spite of the fact that there are many cases of cryptosporidiosis described in animals, there are only a few cases described in humans in Spain, and the *Cryptosporidium* species are not always determined, so there might be more undiagnosed cases of zoonotic cryptosporidiosis. This study shows that the zoonotic transmission cases occurred in Spain, even though its range is unknown. Further epidemiological studies on the transmission of *Cryptosporidium* species are required for a greater understanding of epidemiological aspects of this parasite and its public health risk.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interests to declare.

Acknowledgement

This work was supported by *Ministerio de Sanidad y Consumo* (Ministry of Health) grant FIS-PI09/1585, and DGA.FSE B82.

References

1. Fayer R, Santín M, Macarisin D. *Cryptosporidium ubiquitum* sp. in animals and humans. *Vet Parasitol.* 2010;172:23–32.

2. Wong PH, Ong CS. Molecular characterization of the *Cryptosporidium cervine* genotype. *Parasitology*. 2006;133:693–700.
3. Navarro-i-Martinez L, Del Águila C, Bornay Llinares FJ. *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;29:135–43.
4. Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedraza-Díaz S, McLauchlin J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J Med Microbiol*. 2005;55:703–7.
5. Ong CS, Eisler DL, Alikhani A, Fung VW, Tomblin J, Bowie WR, et al. Novel *cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a *cervine* genotype. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:263–8.
6. Iseki M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn J Parasitol*. 1979;28:285–307.
7. Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasit*. 2008;38:1239–55.
8. Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ, Slemenda SB, da Silva AJ, Moura INS, Arrowood MJ, et al. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerg Infect Dis*. 1999;5:444–9.
9. Llorente MT, Clavel A, Varea M, Goñi MP, Sahagún J, Olivera S. *Cryptosporidium felis* infection, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1471–2.
10. Xiao L, Escalante L, Yang Ch, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:1578–83.
11. Llorente MT, Clavel A, Goñi MP, Varea M, Seral C, Becerril R, et al. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitol Int*. 2007;56:201–5.
12. Díaz P, Quílez J, Chalmers RM, Panadero R, López C, Sánchez-Acedo C, et al. Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology*. 2010;137:1187–93.

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *CRYPTOSPORIDIUM* EN NIÑOS DE ZARAGOZA Y LEÓN.

¹Joanna Cieloszyk, ²Mª Teresa Fernández, ³Silvia Lóbez, ⁴P. Goñi, ⁵Mª Antonia Remacha, ⁶Mª José Gude, ⁷Elena Sánchez, ⁸Cristina Seral, ⁹Francisco J. Castillo, ¹⁰Antonio Clavel.

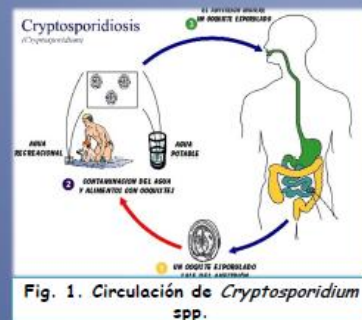
¹Área de Parasitología, Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.

²Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS).

³Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital de León, León, España.

⁴Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, Zaragoza, España.

INTRODUCCIÓN - OBJETIVO



Cryptosporidium spp. es un protozoo que causa diarrea en humanos. Se transmite de persona a persona o por consumo de alimentos contaminados (Fig 1). Es uno de los protozoos más frecuentemente relacionados con trastornos gastrointestinales, sobre todo en niños.

EL OBJETIVO de este estudio es avanzar en el conocimiento de la epidemiología de *Cryptosporidium* en humanos, en España.

MATERIAL Y MÉTODOS

93 muestras de heces procedentes de niños entre 0 y 8 años de Zaragoza (36) y León (57) positivas para *Cryptosporidium* spp, se sometieron a la tinción Ziehl-Neelsen modificada y visualización al microscopio para comprobar la intensidad de la parasitación (Fig. 2).

Posteriormente se llevó a cabo la extracción de DNA, seguida de nested-PCR para amplificación de un fragmento del gen *SSU-rRNA*.

El análisis de polimorfismos (RFLP), con las enzimas *SspI* y *VspI*, permitió identificar la especie (Fig. 3) y la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen que codifica la Glicoproteína GP60 permitió diferenciar los genotipos.

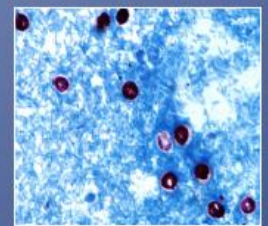


Fig. 2. Oocistos de *Cryptosporidium* spp con la tinción Ziehl-Neelsen modificada.

RESULTADOS



Fig. 3. Patrones RFLP obtenidos:

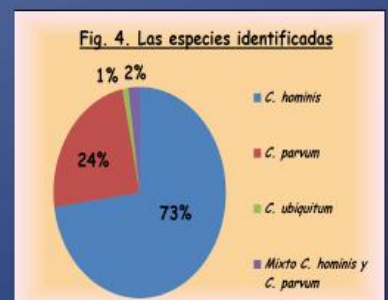
- 1-marcoador APst;
- 2-*C. ubiquitum* (*SspI*);
- 3-*C. parvum* (*SspI*);
- 4-*C. hominis* (*SspI*);
- 5-*C. ubiquitum* (*VspI*);
- 6-*C. parvum* (*VspI*);
- 7-*C. hominis* (*VspI*).

✓ El 47,3% de las muestras correspondió a niños entre 0-2 años, seguido por un 30% de niños entre 3 a 5 años.

✓ El 65,5% de los pacientes infectados con *C. hominis* y el 75% de los pacientes infectados con *C. parvum* pertenecía al ambiente urbano.

✓ Los subgenotipos mayoritarios identificados fueron: IbA10G2R (24,2%) y IIdA17G2 (5,3%).

✓ El 80% de los aislamientos correspondientes al IbA10G2R y todas las muestras pertenecientes al IIdA17G2 procedían de pacientes del medio urbano. En el rural los mayoritarios fueron IbA10G2R y el IIdA20G1.



CONCLUSIONES

- No se encontró asociación estadísticamente significativa, entre especie y ámbito al que correspondían los pacientes, ya que el 65,5% de *C. hominis* y el 75% de *C. parvum* se aislaron en pacientes del entorno urbano.
- La especie identificada mayoritariamente fue *C. hominis* (Fig. 4).
- C. parvum* se encontró solo en 24% de los pacientes. Además en una muestra se ha identificado *C. ubiquitum*, una especie raramente identificada en humanos.

BIBLIOGRAFIA

- Xiao L et al. Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* Parasites Based on the Small-Subunit rRNA Gene Locus. Appl Environ Microbiol. 1999;65(4): 1578-1583
- Cieloszyk J et al. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. Enferm Infecc Microbiol Clín. 2012;30(9):549-51
- *http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/A-F/Cryptosporidiosis/body_Cryptosporidiosis_page1.htm#LifeCycle



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original article

Cryptosporidiosis outbreak in a child day-care center caused by an unusual *Cryptosporidium hominis* subtype

Pilar Goñi^{a,*}, Diego Almagro-Nievas^b, Joanna Cieloszyk^a, Silvia Lóbez^a, José María Navarro-Marí^c, José Gutiérrez-Fernández^{c,d}

^a Area of Parasitology, Department of Microbiology, Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, C/ Domingo Miral s/n, Zaragoza, Spain

^b Metropolitan District of Granada's Epidemiology and Programs Unit, C/ Gustavo Dore, no. 3, Bajo, Granada, Spain

^c Department of Microbiology, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

^d Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Granada, Avenida de Madrid, s/n, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2014

Accepted 5 February 2015

Available online xxx

Keywords:

Cryptosporidium

Giardia

Outbreak

IaA11R2

IbA10G2R2

Assemblage

ABSTRACT

Introduction: This work describes the genetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* involved in an outbreak in a nursery school in Granada, Spain, that affected seven children under the age of 4.

Methods: Nucleic acids were extracted from the seven stool samples positive to *Cryptosporidium* or *Giardia* by microscopy and/or immunochromatography. The species and subtypes of *Cryptosporidium* were identified by PCR-RFLP and PCR of the *SSUrRNA* and *gp60* genes, respectively. The assemblages of *Giardia duodenalis* isolates were characterized by PCR of the *tpi* gene. PCR products were sequenced and analyzed.

Results: All of the isolates were positive for *Cryptosporidium hominis*. Five of them belonged to subtype IaA11R2, one to subtype IbA10G2R2, and the other could not be identified. Three of these samples were positive for *G. duodenalis* by PCR, two belonging to the assemblage A, and the other one to assemblage B.

Discussion: This is the first report of *Cryptosporidium hominis* subtype IaA11R2 as a cause of an outbreak in Europe where subtype IbA10G2R2 is the most frequently identified. In the case of *Giardia*, an outbreak could not be confirmed because of the low number of positive samples and the low genetic variability of the amplified fragments for assemblage A of *tpi* gene.

Conclusions: A new subtype, of *Cryptosporidium hominis* named IaA11R2, has been described as a cause of an outbreak in a nursery school in Granada, Spain. However an outbreak of giardiasis could not be confirmed.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Brote de cryptosporidiosis en una guardería causado por un subtipo inusual de *Cryptosporidium hominis*

RESUMEN

Introducción: Este trabajo describe la caracterización genética de *Cryptosporidium* y *Giardia* implicados en un brote en una guardería de Granada, España, que afectó a 7 niños menores de 4 años de edad.

Métodos: La extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir de las 7 muestras de heces positivas para *Cryptosporidium* o *Giardia* mediante técnicas de microscopía y/o inmunocromatografía. Las especies y subtipos de *Cryptosporidium* fueron identificados por PCR-RFLP y PCR de los genes *SSUrRNA* y *gp60*, respectivamente. Los genotipos de los aislamientos *Giardia duodenalis* fueron caracterizados por PCR del gen *tpi*. Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados y analizados.

Resultados: Todos los aislamientos fueron positivos para *Cryptosporidium hominis*. Cinco de ellos correspondieron al subtipo IaA11R2, uno al subtipo IbA10G2R2 y otro no pudo ser identificado. Tres de las muestras resultaron positivas para *G. duodenalis* por PCR, 2 de ellas pertenecientes al genotipo A y la restante al genotipo B.

Palabras clave:

Cryptosporidium

Giardia

Brote

IaA11R2

IbA10G2R2

Genotipo

* Corresponding author.

E-mail address: pgoni@unizar.es (P. Goñi).

Discusión: Esta es la primera identificación del subtipo IaA11R2 de *Cryptosporidium hominis* como causa de un brote en Europa, donde el subtipo IbA10G2R2 es el más frecuentemente identificado. En el caso de *Giardia*, el bajo número de muestras positivas y la baja variabilidad genética del fragmento del gen *tpi* amplificado para el genotipo A no permitieron confirmar un brote.

Conclusiones: Un nuevo subtipo de *Cryptosporidium hominis*, denominado IaA11R2, ha sido descrito como causa de un brote en una guardería de Granada, España. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten confirmar un brote de giardiasis.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
Todos los derechos reservados.

Introduction

Cryptosporidium spp. (Protoctista, Apicomplexa) is a protozoan parasite that causes gastrointestinal disorders in a large number of hosts including humans and animals. Twenty-six species and more than 40 genotypes have been identified to date, but *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* are the two species that cause 90% of all infections in immunocompetent and immunosuppressed individuals.^{1,2} Both species have been found in Spain in waters, in bivalve molluscs and humans. The predominant species in animals is *C. parvum* whereas in humans, the highest prevalence of *C. hominis* has been documented. Nevertheless, it seems that the predominant species depend on the rural or urban environment, with *C. parvum* more commonly detected in rural and *C. hominis* in urban areas.^{3,4} Both species have been reported to cause outbreaks in the general population and in children under 2 years of age. However, since cryptosporidiosis in Spain is not a notifiable disease, data that do exist concerning this disease are scarce and are not based upon 100% of the population. The discovery of some species such as *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium felis* or *Cryptosporidium ubiquitum* in Spain, and its importance in human epidemiology has also been documented.^{4,5} The most recent method used for identifying subtype families and subtypes of *Cryptosporidium* spp. is the one based on the analysis of the partial sequence of the gene coding for a polymorphic glycoprotein expressed on the sporozoite surface (GP60). To the date there are several subtype families described: nine belonging to *C. hominis* species (Ia–Ig), 14 to *C. parvum* (IIa–III), seven to *C. meleagridis* (IIIa–IIIg) and six to *Cryptosporidium fayeri* (IVa–IVf).^{2,6,7} Each subtype group is subdivided into subgenotypes based on the number of tri-nucleotide repeats coding for the amino acid serine and named following the rules described by Sulaiman et al.^{8,9}

There are few studies about *Cryptosporidium* subtypes in Spain but in general, the predominant subtype is the IbA10G2R2 subtype, although others such as the IaA18R3 subtype has been identified in Navarra in the summer of 2012.¹⁰

In addition, human giardiasis is not a compulsory notifiable disease in Spain, so its spread is difficult to assess. A total of 16974 cases of *Giardia duodenalis* infections were notified to the microbiological information system between 1989 and 2010. Children under 5 years of age accounted for 42.7% of reported cases.¹¹ Most reported outbreaks involved person-to-person contact, although waterborne transmission was also documented. Eight assemblages of *G. duodenalis* have been described to date, but typically only assemblages A and B are associated with human infections. Subassemblage AI mostly infects animals whereas humans are mostly infected with subassemblage AII. In Spain, assemblage B is the most prevalent in human population, and also subassemblage AII and a mixed infection of subassemblage AII and assemblage B have been identified. Subassemblage AI has been found in cattle and sheep and it has not been reported so far in humans.^{11,12}

The aim of this study was the genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* involved in an outbreak in a nursery school in Granada, Spain.

Methods

As previously reported,¹³ the notification and confirmation of a suspected outbreak of acute gastroenteritis (AGE) in a nursery in the municipality of Maracena (Granada, Spain) occurred between September and December 2013. Cases were defined as subjects with diarrhea (defined as the occurrence of at least two consecutive unformed stools) or abdominal pain as clinical criteria and stool samples positive for *G. duodenalis* or *Cryptosporidium* by microscopy and/or immunochromatography as laboratory criteria. In addition, the definition of suspect (every person who meets the clinical criteria, have epidemiological relationship and has been reported by epidemiological survey), probable (every person who meets the clinical criteria, have epidemiological relationship and has been reported by searching through digital medical records) and confirmed case (every person who meets the clinical and laboratory criteria) was made. The methodology to identify the causal agent and its possible domestic origin was created. Fig. 1 shows the distribution of all cases of cryptosporidiosis occurring in Granada in the study period. At all times the outbreak has been contextualized with confirmed cases.

During the epidemic period, 70 children between 0 and 3 years old went to the nursery, which had five classes on two floors and five carers permanently assigned to class. Most of the families of affected children belong to low-medium socio-economic status.

Eighty-two stool samples from 75 subjects were collected and analyzed, including 60 children under the age of 6 who had direct contact at the nursery, nine persons aged between 6 and 16 years old as family members, and six nursery workers older than 16 years old.¹³ Seven individuals were sampled twice.

In this previous study and in order to rule out causes of infection, routine stool culture and antigen detection of rotavirus and adenovirus were performed for all samples. In addition, the presence of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* was investigated

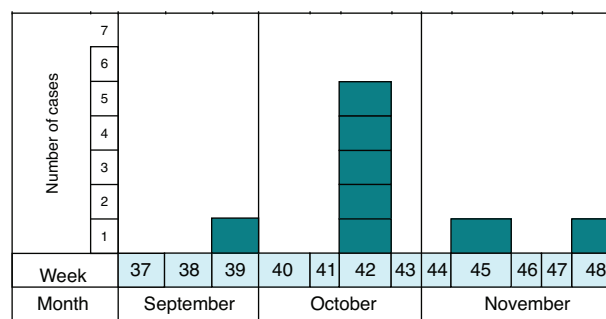


Fig. 1. Temporal distribution of all 2013 confirmed cases of cryptosporidiosis in Granada (Spain) in the period of study ($n=8$).

by immunochromatography (IC) (CerTest Crypto/Giardia, Certest Biotec S.L., Zaragoza, Spain) and in all cases the stool samples were analyzed for the presence of other intestinal parasites by microscopy following standard formalin–ethyl acetate concentration. Also, smears from the concentrated samples were stained with a modified Ziehl–Neelsen stain and examined by means of microscopy to detect *Cryptosporidium* oocysts. In the previous study, all samples were found to be negative on bacteriological isolation and detection of viral antigens. In the parasitological study, seven (13.3%) of the samples from children were positive to *Cryptosporidium* by microscopy and immunochromatography and three of them were also positive for *G. duodenalis* (5%), and one for *Blastocystis hominis*. Adults were not parasitized. None of the parasitized children had a history of previous traveling abroad.¹³ These seven samples that tested positive for microscopy and immunochromatography techniques were assessed by molecular methods in this study.

All samples positive to *Cryptosporidium* and or *G. duodenalis* (7) by microscopy or IC were analyzed by molecular biology techniques to genetic characterize both *Cryptosporidium* and *G. duodenalis* isolates.

Nucleic acids were extracted using DNA stool kit (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canada) following the manufacturer's instructions and stored at -20°C until processing. A 826–864 bp fragment of 18S rRNA subunit (SSUrRNA) was amplified by PCR using the primers and conditions described by Xiao et al. (1999) and restriction fragment polymorphism (PCR-RFLP) with *SspI* and *VspI* (Promega, Madison, USA) was performed to identify *Cryptosporidium* species.¹⁴ SSU1 and SSU2 primers were used in the first PCR in 25 μl of reaction mix with the following conditions: 10 \times PCR buffer (Biotools B & M Labs, S.A., Madrid, Spain), 2 mM MgCl_2 , each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 200 μM , each primer at a concentration of 200 nM, 2.5 U of *Taq* polymerase, and 2 μl of DNA template. A total of 35 cycles, consisting of 94°C for 45 s, 55°C for 45 s, and 72°C for 1 min, were performed; an initial hot start at 94°C for 3 min and a final extension step at 72°C for 7 min were also included. For secondary PCR, 2 μl of the primary PCR product were used, and the reaction was performed with SSU3 and SSU4 primers with identical PCR mixture and cycling conditions used in the primary PCR, except 1.5 mM MgCl_2 was used in a 50 μl PCR mixture of final volume. To identify the families and subtypes, a fragment of the *gp60* gene was amplified using nested PCR.¹⁵ The fragment of 400 bp was amplified using primers AL3531, AL3533 in primary PCR and AL3532, LX0029 in the secondary PCR.¹⁶ Both reactions were performed with a mixture containing 10 \times PCR buffer (Biotools B & M Labs, S.A., Madrid, Spain), 1.5 mM MgCl_2 , each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 200 μM , each primer at a concentration of 200 nM, 2.5 U of *Taq* polymerase, and 5 μl of DNA template or primary PCR product in a final volume of 50 μl . Cycling program include an initial hot start at 95°C for 3 min, 40 cycles, with 95°C for 45 s, 52°C for 45 s, and 72°C for 1 min; and a final extension step at 72°C for 10 min.

G. duodenalis assemblages were determined by a PCR of a 530 bp fragment of triosephosphate isomerase (*tpi*) gene.¹⁶ AL3543 and AL3546 primers were used in a primary PCR with a reaction mixture containing 10 \times PCR buffer (Biotools B & M Labs, S.A., Madrid, Spain), 3 mM MgCl_2 , each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 200 μM , each primer at a concentration of 200 nM, 2.5 U of *Taq* polymerase, and 5 μl of DNA template in a final volume of 50 μl . A secondary PCR was performed using AL3543 and AL3546 primers at a concentration of 200 nM and 100 nM respectively, in 10 \times PCR buffer (Biotools B & M Labs, S.A., Madrid, Spain), 2 mM MgCl_2 , each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 200 μM , 2.5 U of *Taq* polymerase, and 5 μl of primary PCR product in a final volume of 50 μl . Both reactions were performed under the following conditions: a hot start of 94°C for

5 min, 35 cycles, with 94°C for 45 s, 50°C for 45 s, and 72°C for 1 min; and a final extension step at 72°C for 10 min.

In all reactions positive and negative controls have been included with DNA of a previous characterized isolate and replacing the DNA by sterile double distilled water, respectively.

All PCR products were purified with Illustra™ GFX™ PCR DNA Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) and direct sequenced in both directions in an external laboratory (Citogen, S.L., Zaragoza, Spain). The nucleotide sequences obtained were analyzed and compared with those registered in GenBank using Chromas 2.4.1.0, BioEdit 7.0.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit>) and MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>).

The DNA sequences obtained have been deposited in the genetic sequence database (GenBank) at the National Center for Biotechnology Information (Table 1).

Results

The diagnosis of these seven positive samples was confirmed with the nested PCR analysis of the SSUrRNA PCR gene. RFLP analysis of the secondary PCR products with restriction enzymes *SspI* and *VspI* showed a band profile consistent with *C. hominis* patterns: 450, 267, 108-bp and 561, 111-bp, respectively.

When PCR of *gp60* gene was performed to determine *Cryptosporidium* subtype, the expected amplicon of about 400 bp was obtained for the seven samples. The sequence analysis showed that five isolates belong to subtype IaA11R2, one to subtype IbA10G2R2 and the other one could not be sequenced. The sequences obtained for the amplification of the fragment of the SSUrRNA gene were identical to each other, while those corresponding to the amplified fragment of the gene encoding the glycoprotein GP60 for the subtype IaA11R2 presented homologies between 99.4% and 100%. The single nucleotide polymorphisms (SNP) found in these sequences are shown in Fig. 2. None of them affects the variable tandem repeat region of the serine-coding trinucleotide (TCA/TCG/TCT), which is the primary target of the *gp60* typing methods or the repetitions located immediately after the trinucleotide repeats and represented by the letter R. Changes in nucleotide 227 (C \rightarrow A) in the nucleotide sequence obtained for the strain 194 implies changing S by Y in position 85 of the resulting protein. In the isolate 182, a change of C to T at positions 305 and 308 of the nucleotide sequence obtained for the amplified fragment involves a change of T to I at positions 102 and 103 of the amino-acidic sequence of the protein.

On the other hand three of the children's samples, all of them containing *Cryptosporidium* subtype IaA11R2, were also positive for *G. duodenalis* by PCR, identifying the assemblages A and B of *G. duodenalis* in two and one sample, respectively (Fig. 2).

Table 1 shows a resume of clinical and epidemiological data with laboratory results and accession numbers in GenBank for the sequences obtained in this work.

Discussion

C. hominis has been identified as the cause of an outbreak that affects seven children in a nursery in Granada (Spain). Human cryptosporidiosis is commonly caused by *C. hominis* or *C. parvum*, being the transmission of *C. hominis* exclusively anthroponotic.¹⁷

In this work, two subtypes have been identified in six of the seven cases, a new non-reported subtype named IaA11R2, found in five of the six cases, and subtype IbA10G2R2 the other case. The coincidence in species and subtype, along with the high homology of the sequences obtained for the five cases in which the subtype found was IaA11R2 and epidemiological evidence supports the occurrence of an outbreak of cryptosporidiosis.

Table 1
Resume of clinical and epidemiological data with laboratory results.

Sample	Age	Sex	Symptoms	Microscopy	IC	PCR-sequencing <i>Cryptosporidium</i> Accession number GenBank	PCR-sequencing <i>Giardia</i> Accession number GenBank
180	2	F	Diarrhea	<i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>Giardia</i> (+)/ <i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>C. hominis</i> subtype IaA11R2 KJ910019	Assemblage B KJ941323
181	2	F	Diarrhea and fever	<i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>Giardia</i> (+)/ <i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>C. hominis</i> subtype IaA11R2 KJ910020 KJ910026	Assemblage A KJ941324
182	2	F	Diarrhea	<i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>Giardia</i> (-)/ <i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>C. hominis</i> subtype IaA11R2 KJ910021	Assemblage A KJ941325
190	2	F	Diarrhea	<i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>Giardia</i> (-)/ <i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>C. hominis</i> subtype IaA11R2 KJ910023	
191	2	F	Vomiting and diarrhea	<i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>Giardia</i> (-)/ <i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>C. hominis</i> -	
194	1	M	Diarrhea and abdominal pain	<i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>Giardia</i> (-)/ <i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>C. hominis</i> subtype IaA11R2 KJ910024 -	
192	2	M	Diarrhea and fever	<i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>Giardia</i> (-)/ <i>Cryptosporidium</i> (+)	<i>C. hominis</i> subtype IbA10G2R2 KJ910025	

IC, immunochromatography.

In Spain, few outbreaks have been described in the literature. In 2000, Rodríguez-Salinas Pérez et al. described an outbreak in Guadarrama (Madrid),¹⁸ which affected 21 preschool children; in 2003, Pedalino et al. reported an outbreak which affected 391 people with cryptosporidiosis among tourists who stayed in the same hotel in Mallorca.¹⁹ Subsequently, in 2012, Artieda et al. reported an outbreak that affected 26 persons in a child day-care center in Guipuzcoa.²⁰ However, the determination of *Cryptosporidium* species and subtype was not performed in any of these cases, inferring the presence of an outbreak based on epidemiological data.

As predominant species, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* and *C. ubiquitum* have been found infecting humans in Spain, being *C. hominis* predominant in urban environments, but also with a high presence in rural environments.^{4,5,21}

Cryptosporidium families have geographical distribution, and in Europe and Australia most *C. hominis* infections are caused by the Ib family.²² Of the *C. hominis* subtypes, the Ia subtype has been identified in humans in some countries such as Peru,²³ China,²⁴ Australia,²⁵ Malaysia,²⁶ Bangladesh,⁶ USA,²⁷ although in no case has it been the most common subtype. As far as we know, in Europe, it has been detected only in Portugal and recently in Spain.^{10,28} Also,

Ia family has been associated with diarrhea, nausea and vomiting in children.²⁹

With respect to subtypes of *C. hominis*, the identification of IbA10G2R2 and IaA21G1R1 has been reported in a study conducted by Jex and Gaser (2008) in people who have traveled to Spain.²⁵ These authors suggest that the latter subtype, IbA10G2R2, is the main subtype of *C. hominis* in Europe. Also, Abal-Fabeiro et al. (2014) identified the family Ib as the subtype of *C. hominis* predominant in Santiago de Compostela.²¹ So far as we know, this paper describes for the first time the subtype IaA11R2 as the cause of an outbreak in a nursery. The literature up to now shows that subtype IaA11R3, which is the most similar to IaA11R2 was found in Bangladesh,⁶ IaA11R4 in Peru,²³ IaA19R3 in Portugal²⁸ and in Canada,³⁰ IaA17R1 in Australia³¹ and IaA12R3 in USA (but in that case the patient had traveled to Pakistan).³¹

However, the presence of *G. duodenalis* in the sample from three of the children concerned is interesting. In addition, *G. duodenalis* isolates belong to different *G. duodenalis* assemblages, two of them to *G. duodenalis* assemblage A and one to *G. duodenalis* assemblage B. The homology between the sequences of *G. duodenalis* assemblage A was 99.7%, although the fragment studied did not exhibit enough polymorphism to differentiate within the *G. duodenalis*

```

180 GP60 1 CCGGCCGTTCCACTCAGAGGCACCTTGAAGGATGTTTCTGTTGAGGGATCATCATCATCATCATCATCATCAACATCGA
181 GP60 1 .....
182 GP60 1 .....
190 GP60 1 .....
194 GP60 1 .....

180 GP60 101 CTCCAAGAAAGAAAGAACTGTAGAGGGCGGCACGGAAGGAAAGAAAGAAAGCAGTCCAGGTTCTGAAGAACAGACGGTGGTAA
181 GP60 101 .....
182 GP60 101 .....
190 GP60 101 .....
194 GP60 74 .....

180 GP60 201 TAAGGAAACGGTGAAGGAGACACAGTAGACGGGGAAACAAACGGGAGTGTTCTCAAGTTACTCCATCTGGAAGTGCCGGCACAGCT
181 GP60 201 .....
182 GP60 201 .....
190 GP60 201 .....
194 GP60 174 .....A.....

180 GP60 301 GCAACTACTACTCCAAAGGAAGAATGTGGTACTTCATTGTAA 343
181 GP60 301 ..... 343
182 GP60 301 ...T..T..... 343
190 GP60 301 .....C. 343
194 GP60 257 ..... 257

```

Fig. 2. Alignment of common fragment sequences obtained for the *gp60* gene of *Cryptosporidium hominis*. SNP are marked.

assemblage A isolates. This low variability coupled with the small number of cases of the same assemblage prevents the differentiation of isolates. Therefore the presence of a simultaneous outbreak of cryptosporidiosis and giardiasis could not be assured. Several studies in different regions of Spain have detected *G. duodenalis* assemblage A, although *G. duodenalis* assemblage B was always identified as prevalent.^{12,32–34} *G. duodenalis* has been detected only in three of the children together with cryptosporidiosis and of them two belonged to assemblage A. Both parasites could be acquired together but this fact could not be confirmed. *G. duodenalis* assemblage A was also considered to be human-specific, although two studies have reported its presence in dog samples.^{35,36} Also this assemblage has been associated with the presence of symptoms in children while assemblage B has been associated with asymptomatic infection.³³ In this case asymptomatic individuals have not been detected. Furthermore, the simultaneous presence of *Cryptosporidium* and *G. duodenalis* in various patients did not allow to establish a relationship between symptoms and assemblage of *G. duodenalis*, in contrast with those reported by Mateo et al. (2014), who in a study conducted in nurseries in Madrid, obtained 82.4% of positive cases for *G. duodenalis* and *Cryptosporidium* asymptomatic, with all the *G. duodenalis* identified belonging to subassemblage BIV.³⁴

Our results indicate that more studies about *Cryptosporidium* and *G. duodenalis* genotyping are needed to identify the populations that are spreading in Spain, and establish their potential geographical specificity and their transmission path.

Ethical statement

The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was funded by DGA-FSE Research Team B82, and Project UZ2013-FIS-02 University of Zaragoza.

References

1. Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol.* 2010;124:90–7.
2. Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology.* 2014;141:1667–85.
3. Navarro-i-Martínez L, del Águila C, Bornay-Llinares FJ. *Cryptosporidium*: a genus in revision. The situation in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:135–43.
4. Llorente MT, Clavel A, Goñi MP, Varea M, Seral C, Becerril R, et al. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitol Int.* 2007;56:201–5.
5. Cieloszyk J, Goñi P, García A, Remacha MA, Sánchez E, Clavel A. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:549–51.
6. Hira KG, Mackay MR, Hempstead AD, Ahmed S, Karim MM, O'Connor RM, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. from Bangladeshi children. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2307–10.
7. Power ML, Cheung-Kwok-Sang C, Slade M, Williamson S. *Cryptosporidium fayeri*: diversity within the GP60 locus of isolates from different marsupial hosts. *Exp Parasitol.* 2009;121:219–23.
8. Plutzer J, Karanis P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet Parasitol.* 2009;165:187–99.
9. Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, et al. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2805–9.
10. Fuentes I, Martín C, Beristain X, Mazón A, Saugar JM, et al. *Cryptosporidium hominis* genotypes involved in increased incidence and clusters of cases, Navarra, Spain, 2012. *Epidemiol Infect.* 2014;14:1–4. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268814001836>.
11. Carmena D, Cardona GA, Sánchez-Serrano LP. Current situation of *Giardia* infection in Spain: implications for public health. *World J Clin Infect Dis.* 2012;2:1–12. <http://dx.doi.org/10.5495/wjcid.v2.i1.1>.
12. Goñi P, Aldana DE, Clavel A, Seral C, Remacha MA, Castillo FJ. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblage B in humans in Zaragoza and León, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:710–2.
13. Gutiérrez-Fernández J, Almagro-Nievas D, Heras-Cañá V, Navarro-Mari JM. Bioaccumulation of *Giardia* and *Cryptosporidium* coproantigen in a child's human environment. *An Pediatr (Barc).* 2015;82:204–5.
14. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:1578–83.
15. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2744–7.
16. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:1444–52.
17. Cacciò SM. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia.* 2005;47:185–92.
18. Rodríguez-Salinas Pérez E, Aragón Peña AJ, Allue Tango M, López Pérez MA, Jiménez Maldonado M, Domínguez Rodríguez MJ. Outbreak of cryptosporidiosis in Guadarrama (Autonomous Community of Madrid). *Rev Esp Salud Pública.* 2000;74:527–36.
19. Pedalino B, Garvey P, Igoe D. Cryptosporidiosis outbreak among Irish Holiday-makers, Spain, July 2003. *Epi-Insight.* 2013;4:1.
20. Artieda J, Basterrechea M, Arriola L, Yague M, Albusa E, Arostegui N, et al. Cryptosporidiosis in a child day-care centre in Gipuzkoa, Spain, October to December 2011. *Euro Surveill.* 2012;17, pii: 20070. Erratum in: *Euro Surveill* 2012;17(6). pii: 20077.
21. Abal-Fabeiro JL, Maside X, Llovo J, Bello X, Torres M, Treviño M, et al. High-throughput genotyping assay for the large-scale genetic characterization of *Cryptosporidium* parasites from human and bovine samples. *Parasitol.* 2014;141:491–500.
22. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol.* 2010;124:80–9.
23. Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, et al. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1567–74.
24. Feng Y, Li N, Duan L, Xiao L. *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. *J Clin Microbiol.* 2009;47:153–7.
25. Jex AR, Gasser RB. Analysis of the genetic diversity within *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis by mutation scanning. *Electrophoresis.* 2008;29:4119–29.
26. Lim YAL, Iqbal A, Surin J, Sim BLH, Jex AR, Nolan MJ, et al. First genetic classification of *Cryptosporidium* and *Giardia* from HIV/AIDS patients in Malaysia. *Inf Genet Evol.* 2011;11:968–74.
27. Feng Y, Tiao N, Li N, Hlavsa M, Xiao L. Multilocus sequence typing of an emerging *Cryptosporidium hominis* subtype in the United States. *J Clin Microbiol.* 2014;52:524–30.
28. Alves M, Xiao L, Antunes F, Matos O. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol Res.* 2006;99:287–92.
29. Cama VA, Ross JM, Crawford S, Kawai V, Chavez-Valdez R, Vargas D, et al. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Inf Dis.* 2007;196:684–91.
30. Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, Martin SW, et al. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitol Res.* 2006;99:346–52.
31. Chalmers RM, Hadfield SJ, Jackson CJ, Elwin K, Xiao L, Hunter P. Geographic linkage and variation in *Cryptosporidium hominis*. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:496–8. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1505.081419>.
32. Cardona GA, Carabin H, Goñi P, Arriola L, Robinson G, Fernández-Crespo JC, et al. Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. *Sci Total Environ.* 2011;412:101–8.
33. Sahagún J, Clavel A, Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, et al. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27:81–3.
34. Mateo M, Mateo M, Montoya A, Bailo B, Saugar JM, Aguilera M, et al. Detection and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children attending day care centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Medicine (Baltim).* 2014;93:e75.
35. Eligio-García L, Cortés-Campos A, Cota-Guajardo S, Gaxiola S, Jiménez-Cardoso E. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using beta-giardin restriction gene. *Vet Parasitol.* 2008;156:205–9.
36. Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology.* 2004;128 Pt 3:253–62.